

Interaktionen zwischen T-Helfer-Zellen und Synoviozyten im experimentellen Arthritismodell

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl. Ing. (FH) Marion Hückel

geboren am 15.04.1966 in Saarbrücken

GUTACHTER:

Prof. Dr. Rolf Bräuer

Institut für Pathologie, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Prof. Dr. Siegmund Reißmann

Institut für Biochemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Prof. Dr. Andreas Radbruch

Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin (DRFZ)

Tag der Verteidigung: 23.06.2003

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Rheumatoide Arthritis – Charakteristika und zelluläre Vorgänge	1
1.2. Funktion der Synoviozyten im Synovium	3
1.3. Zelluläre Interaktionen	5
1.4. Degradationsprozesse im Gelenkknorpel	10
1.5. Zielstellung	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. Materialien	16
2.1.1. Geräte	16
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3. Medien, Puffer und Reagenzien	17
2.1.3.1. Kulturmedien und Puffer	17
2.1.3.2. Reagenzien	18
2.2. Methoden	19
2.2.1. Tiere und Haltungsbedingungen	19
2.2.2. Antigen-induzierte Arthritis	19
2.2.3. Präparation der Synoviozyten	19
2.2.4. Präparation der T-Zellen	20
2.2.5. Charakterisierung der T-Zellen	23
2.2.6. Kokultur von Synoviozyten mit MNZ oder T-Zellen bzw. T-Zellsubpopulationen	24
2.2.7. Analyse der Kulturüberstände	25
2.2.7.1. NO-Bestimmung	25
2.2.7.2. Bestimmung von Zytokinen und PGE ₂	26
2.2.7.3. Bestimmung der MMP	28
2.2.8. Bestimmung von Oberflächenmolekülen	30
2.2.9. Apoptose-Test	31
2.2.10. Präparation für raserelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM)	31
2.2.11. Kontrolle der Mykoplasmenfreiheit der Kulturansätze	32
2.2.12. Statistische Auswertung	32

3. ERGEBNISSE	33
3.1 Wirkung von Th-Zytokinen auf Synoviozyten	33
3.1.1. Einfluß von Th-Zytokinen auf unstimulierte Synoviozyten	33
3.1.2. Einfluß von IFN- γ auf stimulierte Synoviozyten	37
3.1.3. Zusammenfassung	41
3.2. Kokultur von Synoviozyten mit stimulierten T-Zellen	42
3.2.1. Modulation der Synoviozytenaktivität durch <i>in vitro</i> stimulierte CD4 ⁺ und CD4 ⁻ T-Zellen	42
3.2.2. Modulation der Zytokinsekretion von stimulierten T-Zellen durch Synoviozyten	47
3.3. Beeinflussung der Apoptose von Synoviozyten durch Kontakt mit verschiedenen Matrices und Kokultur mit stimulierten mononukleären Zellen	49
3.4. Kokultur von Synoviozyten mit naiven und arthritischen Th-Zellen	51
3.4.1. Modulation der Synoviozytenaktivität durch naive und arthritische Th-Zellen	51
3.4.2. Modulation der Zytokinsekretion der Th-Zellen durch Synoviozyten	56
3.5. Kokultur von Synoviozyten mit Th-Zellen von arthritischen TNF- α -defizienten Mäusen	57
3.6. Kokultur von Synoviozyten mit Th-Subpopulationen	61
3.6.1. Kokultur von Synoviozyten mit <i>in vitro</i> generierten Th1- und Th2-Zellen	61
3.6.2. Kokultur von Synoviozyten mit <i>ex vivo</i> separierten IFN- γ ⁺ und IFN- γ ⁻ Th-Zellen	67
3.6.3. Zusammenfassung	71
3.7. Modulation der Kokulturen durch Zytokine oder TGF- β	72
3.7.1. Modulation von unstimulierten und TNF- α -stimulierten Kulturen mit TGF- β 1	72
3.7.2. Modulation mit IFN- γ	76
3.7.3. Modulation mit IL-4	78
3.7.3. Zusammenfassung	81
4. DISKUSSION	82
4.1 Modulation der Synoviozytenaktivität durch Th-Zytokine	82
4.2 Modulation der Synoviozytenaktivität durch CD4 ⁺ und CD4 ⁻ T-Zellen	85
4.3. Hemmung der Apoptose durch Zellkontakt	88
4.4. Stimulierung der Synoviozyten in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand der Th-Zellen	89
4.5. Regulierung der T-Zellaktivität durch Synoviozyten	90
4.6. Die Rolle von TNF- α bei der Stimulierung von Synoviozyten	92
4.7. Die Rolle der Th-Subpopulationen	93
4.8. Modulation der zellulären Interaktionen durch TNF- α und TGF- β	97
4.9. Modulation der zellulären Interaktionen mit löslichem IFN- γ , einem Th1-Zytokin	99
4.10. Modulation der zellulären Interaktionen mit löslichem IL-4 , einem Th2-Zytokin	100
4.11. Schlußfolgerungen	102

5. ZUSAMMENFASSUNG	104
6. LITERATURVERZEICHNIS	106
7. DANKSAGUNG	120

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif</i>
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
Ag	Antigen
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
APMA	Aminophenylmercuriacetat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Differenzierungs-Cluster (<i>cluster of differentiation</i>)
CELISA	Cell-Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvans (<i>complete Freund's adjuvant</i>)
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (<i>collagen induced arthritis</i>)
CRP	C-reaktives Protein
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	Experimentelle allergische Encephalomyelitis
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay
FACS	Durchflußzytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
Fc	Kristallisierbares Fragment (<i>fragment cristable</i>)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAG	Glucosaminoglycan
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Factor
HEPES	Hydroxyethyl-piperazin-ethan-sulfonsäure
i.a.	intraartikulär
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1RA	IL-1-Rezeptor Antagonist
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxyd Synthetase (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
K I	Kollagen Typ I
K II	Kollagen Typ II
K III	Kollagen Typ III
K _{cat}	Umsatzzahl
k _m	Michaelis-Menten-Konstante
KM	Komplettes Medium
K.O.	<i>knock-out</i>
LFA	<i>lymphocyte function-associated antigen</i>
Lk	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid

mAk	Monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetische Zelltrennung (<i>magnetic-activated cell sorting</i>)
mBSA	methyliertes Rinderserumalbumin (<i>methyalted bovine serum albumin</i>)
Mca	7-Methoxycoumarin-4-yl-acetyl
MCP	Monocyten Chemotaktisches Protein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MT-MMP	Membran-Typ Metalloproteinase
MTT	(3-(4,5)-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid
MMP	Matrixmetalloprotease
MNZ	Mononukleäre Zellen
MPC	<i>magnetic particle concentrator</i>
Mw	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
Mz	Milz
NEM	N-Ethylmaleimid
NK	Natürliche Killerzellen
NT	Normaltier
OA	Osteoarthritis
O.D.	Optische Dichte
OPD	ortho-Phenylendiamin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Periphere Mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Phytoerythrin
PG	Proteoglycan
PGE	Prostaglandin E
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO	Peroxidase
RA	Rheumatoide Arthritis
REM	Rasterelektronenmikroskop
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPMI	Rosewell Park Memorial Institut
RF	Rheumafaktor
RT	Raumtemperatur
SCID	Schwere kombinierte Immunschwäche (<i>severe combined immunodeficiency</i>)
SDF	<i>stromal cell-derived factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SF	Synovialflüssigkeit
SM	Synovialmembran
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
SZ	Synoviozyten
TdT	Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
Th	T-Helferzelle
TIMP	<i>tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases</i>
TNF	Tumornekrosefaktor

t-PA	<i>tissue- type plasminogen activator</i>
u-PA	<i>urokinase-like plasminogen activator</i>
VCAM	Vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül (<i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VLA	<i>very late antigen</i>
WT	Wildtyp

1. EINLEITUNG

1.1 Die Rheumatoide Arthritis – Charakteristika und zelluläre Vorgänge

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Systemerkrankung mit autoimmunem Charakter, die hauptsächlich durch chronische Entzündung der Gelenke sowie Destruktion des Knorpels und der Knochen gekennzeichnet ist. Sie wird auch als chronische Polyarthritis bezeichnet. Überwiegend sind die Finger-, Hand- und Fußgelenke betroffen. Extraartikuläre Manifestationen wie z.B. Rheumaknoten, Vaskulitis und ein entzündlicher Befall von Sehnenscheiden, Schleimbeuteln, innerer Organe und Augen können zu zusätzlichen beträchtlichen Behinderungen des Patienten führen. Die Ursache der Erkrankung ist bisher unbekannt, und es gibt keine Therapie, die zur Heilung führt. Eine medikamentöse Behandlung kann die Progression der Gelenkzerstörung lediglich verlangsamen und verursacht hohe Kosten. Aus diesem Grund ist es wichtig, die immunologischen Mechanismen im Pathogeneseprozeß aufzuklären, um neue therapeutische Ansatzpunkte zu finden.

Die Entzündung der Gelenke ist verbunden mit einer massiven Infiltration von Immunzellen. Die synoviale Deckzellschicht (Gelenkinnenhaut), normalerweise aus 1-3 Schichten Synoviozyten bestehend, weist im Krankheitsbild eine starke Hyperplasie auf. Das tumorähnliche Wachstum von Zellen in ein hochvaskuläres Gewebe, den Pannus, ist ein Charakteristikum der RA. Der Pannus besteht aus verschiedenen Zelltypen, u.a. aus den residenten Synoviozyten und infiltrierenden mononukleären Zellen, die in der Lage sind, eine Anzahl von Entzündungsmediatoren zu synthetisieren und die zum Knorpelabbau führen (Gay et al., 1993; Yanni et al., 1994; Zvaifler und Firestein, 1994). Des weiteren können Lymphfollikel mit Keimzentren auftreten, in denen zahlreiche B-Zellen in engem Kontakt mit T-Zellen vorkommen (Cush und Lipsky, 1991; Mac Lennan et al., 1997).

Das lymphozytäre Infiltrat besteht zu 80 % aus T-Zellen, von denen ca. 40 % CD4⁺ T-Helferzellen (Th) sind (Kinne et al., 1997). In der Synovialflüssigkeit kommen überwiegend neutrophile Granulozyten vor, während sich im Synovialgewebe reichlich Makrophagen und T-Zellen befinden. Makrophagen produzieren große Mengen von Entzündungsmediatoren, darunter proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 sowie Stickstoffmonoxyd (NO) (Burmester et al., 1997; Kinne et al., 2000; Simon et al., 2001).

Die Ätiologie der RA ist bis heute nicht entschlüsselt. Es wird vermutet, daß die autoimmunen Prozesse in entsprechenden Personen mit genetischer Prädisposition durch ein exogenes Agens ausgelöst werden, die dann zu einer massiven Entzündung und Destruktion der Gelenke führen (Maini et al., 1995). Die Assoziation der RA mit HLA-DR-Allelen bzw. mit einer bestimmten Sequenz in verschiedenen MHC II-Molekülen (shared epitope hypothesis) weist darauf hin, daß auch T-Zellen am Pathogeneseprozeß beteiligt sind. So sind unter den Kaukasieren 60-70% aller Patienten HLA-DR4-positiv, aber auch andere genetische Faktoren könnten zur Pathogenese beitragen.

T-Zellen und T-Zell-abhängige Immunmechanismen spielen wahrscheinlich schon bei der Initiation der Krankheit eine wichtige Rolle, da sie schon in einer frühen Phase das Gelenk infiltrieren (Gaston,

1998). Auf die Abhängigkeit von T-Zellen weisen ferner einige Depletions- und Transferexperimente hin: SCID-Mäuse entwickeln nach Applikation von stimulierten T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten eine schwere destruktive Arthritis (Sakata et al., 1996), während mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut die Arthritis nicht transferieren konnten (Sack et al., 1996). Dies läßt vermuten, daß die T-Zellen, die an der Entzündung und Destruktion beteiligt sind, im wesentlichen am Ort des Geschehens und weniger in der Peripherie lokalisiert sind. Petrow et al. (1996a) konnten durch Depletion von $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen vor dem Transfer in SCID-Mäuse zeigen, daß für die Übertragung der Arthritis die $CD4^+$ Th-Zellen entscheidend sind.

Die Funktion der Th-Zellen bei der Unterhaltung der Gelenkentzündung ist noch relativ unklar. So sind in der chronisch entzündeten Synovialmembran nur geringe Mengen der Th-Zell-Zytokine im Vergleich zu den in großen Mengen vorhandenen Monokinen nachweisbar (Simon et al., 1994). Jedoch scheinen T-Zellen die Aktivität von Makrophagen zu regulieren, denn nach Eliminierung von T-Zellen aus dem synovialen Zellinfiltrat reduzierte sich auch die Anzahl der Makrophagen und der von ihnen sezernierten Monokine. Außerdem verringerte sich als weitere Folge der Anteil der mRNA für MMP-1 und MMP-2 im Synovialgewebe (Klimiuk et al., 1999a). Unter den zahlreichen T-Zellen dominieren in den perivaskulären Arealen vor allem Th-Zellen vom Memory-Phänotyp ($CD4^+CD29^+CD45RO^+$) (Cush und Lipsky, 1991; Wagner et al., 1998). Sie kommen auch in der Synovialflüssigkeit vor und bilden dort proinflammatorisches IL-17 (Ziolkowska et al., 2000). Die T-Zellen in der Synovialis befinden sich überwiegend in einem aktivierten Zustand, nachgewiesen durch zahlreiche Aktivierungsmarker wie VLA-1, VLA-4, CD69, CDw60 und IL-2R (Maini et al., 1995).

Bei der RA wie auch bei einigen anderen Autoimmunerkrankungen (z.B. Multiple Sklerose, insulinabhängiger Diabetes mellitus) dominieren Th-Zellen vom Typ I (Th1) (Miltenburg et al., 1992; Adorini et al., 1996). Für diese Th1-Zellen wurde eine verstärkte Einwanderung in entzündete Gewebe, z.B. arthritische Gelenke, nachgewiesen (Astrup et al., 1997). Th1-Zellen unterstützen die zelluläre Immunantwort und sind für die verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (DTH) verantwortlich. Sie produzieren hauptsächlich die Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- β , stimulieren B-Zellen zur Proliferation und Produktion von Immunglobulinen der Subklassen IgG2a und IgG2b. Als Gegenspieler stimulieren die Th2-Zellen die humorale Immunantwort. Sie sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 und fördern den Immunglobulin-Switch zu IgG1 und IgE. Beide Th-Subpopulationen inhibieren sich gegenseitig in ihrer Entwicklung: IFN- γ inhibiert die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th2-Zellen und IL-4 inhibiert die Differenzierung zu Th1-Zellen.

Ein weiteres Indiz dafür, daß im entzündeten Gelenk die Th-Zellen vom Th1-Typ überwiegen, ist der nachweisbare Chemokinrezeptorpool: In der Synovialis werden überwiegend T-Zellen mit den Chemokinrezeptoren CXCR3 und den für Th1-Zellen typischen CCR5 gefunden, während nur wenige Zellen mit den typischen Th2-Chemokinrezeptoren CCR3 zu finden sind (Loetscher et al., 1998). Auch Untersuchungen an Tiermodellen wie der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) (Mauri et al., 1996) und der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) (Simon, 2000) zeigten eine Verschiebung des

Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung Th1-Zellen. Die Verschiebung im AIA-Modell wurde anhand von Zytokinfärbungen isolierter Zellen aus Lymphknoten sowie ELISA-Bestimmungen der Zytokine in Zellkulturüberständen und Immunglobulin-Subklassen nachgewiesen. Durch hohe IFN- γ - und TNF- β -Spiegel werden Makrophagen aktiviert, die mit einer verstärkten Sekretion von IL-1, IL-6 und TNF- α reagieren, Mediatoren, die zur Induktion von matrixabbauenden Enzymen führen.

1.2 Funktion der Synoviozyten im Synovium

Die oberste Schicht der Synovialmembran besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen, den makrophagenähnlichen Synoviozyten (Typ A) und den fibroblastenähnlichen Synoviozyten (Typ B). Letztere werden häufig auch als synoviale Fibroblasten oder einfach nur Synoviozyten bezeichnet. Sie sind für die Synthese der extrazellulären Bestandteile, insbesondere Hyaluronsäure, Fibronectin und Kollagen verantwortlich und produzieren die für die Kollagensynthese notwendige Prolyl-4-hydroxylase. Elektronenmikroskopisch weisen sie ein ausgeprägtes Rauhes Endoplasmatisches Reticulum und multiple Golgi-Apparate auf (Iwanaga et al., 2000). Die Typ A-Synoviozyten werden auch als residente oder Gewebe-Makrophagen bezeichnet. Sie exprimieren Makrophagenmarker, besitzen einen großen Golgi-Apparat und haben die Fähigkeit zur Phagozytose. Sie enthalten viele Mikrovesikel, Lysosome und eine dichtes Chromatin (Cutolo et al., 1993), alles typische Makrophageneigenschaften. Typ A-Zellen können auch als Antigen-präsentierende Zelle (APZ) fungieren. Man nimmt heute an, daß die makrophagenähnlichen Synoviozyten ihren Ursprung im Knochenmark haben, während die Typ B-Zellen mesenchymalen Ursprungs sind. Es sind darüber hinaus auch noch Zellen des intermediären Typs oder dendritische Zellen beschrieben worden (Kitagawa et al., 1993), die aber von Iwanaga et al. (2000) durch transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (TEM) den Typ B-Zellen zugeordnet wurden. Eine andere Hypothese geht davon aus, daß die verschiedenen Zelltypen nur funktionelle Varianten einer Zelllinie sind (Iwanaga et al., 2000). Im normalen Synovialgewebe überwiegen die Zellen des Typ B (in der Maus 80 %). Im Ultrastrukturbild eines Synovialgewebes aus RA-Patienten erscheinen die meisten Synoviozyten transformiert und ca. 3 % befinden sich in verschiedenen Stadien der Apoptose (Matsumoto et al., 1996). Die fibroblastenähnlichen Synoviozyten aus dem Synovium weisen eine erhöhte Oncogenexpression auf, setzen proteolytische Enzyme und Zytokine frei und zeigen eine verstärkte Expression von Proliferationsmarkern (Tak und Bresnihan, 2000). Die makrophagenähnlichen Synoviozyten sekretieren vermehrt IL-1 β , TNF- α und MCP-1.

Der Hyperplasie der synovialen Deckzellschicht und dem entzündlichen Pannusgewebe als charakteristisches morphologisches Merkmal der Arthritis wird eine maßgebliche Beteiligung an der Gelenkschädigung beigemessen. Dabei scheinen sowohl die makrophagenähnlichen Typ A-Synoviozyten als auch die fibroblastenähnlichen Typ B-Synoviozyten beizutragen (Unemori et al., 1991, Zvaifler und Firestein, 1994). In der Invasionszone des RA-Pannus werden sowohl mesenchymale,

transformiert erscheinende fibroblastoide Zellen (Shiozawa et al., 1983; Qu et al., 1994) als auch makrophagenähnliche Synoviozyten (Edwards, 1995; Sack et al., 1996) gefunden. Die Synoviozyten scheinen eine starke Wachstumsfähigkeit im rheumatoiden Synovium zu besitzen und sich insbesondere an den Pannus-Läsionen monoclonal zu vermehren (Imamura et al., 1998). Von Bernabeu et al. (1987) wurde zum ersten Mal nachgewiesen, daß Synoviozyten, isoliert aus arthritischen Ratten, gegenüber Synoviozyten aus normalen Gelenken aktiviert vorliegen. Eine Ursache dieser Veränderung des Phänotyps wird hauptsächlich in den Zytokinen gesehen (Unemori et al., 1991). Mentzel (1996) konnte nachweisen, daß isolierte Synoviozyten aus arthritischen Gelenken von Ratten ihren transformierten Zustand bezüglich des destruktiven und invasiven Vermögens auch über mehrere Passagen in der *In-vitro*-Kultur beibehalten. Sie wiesen in den Kulturen von Synoviozyten aus arthritischem Gewebe wesentlich höhere IL-6-, NO- und MMP-Mengen nach (Mentzel und Bräuer, 1998), als in Synoviozytenkulturen von gesunden Ratten. Auch tierexperimentelle Untersuchungen unterstreichen die starke Beteiligung der Synoviozyten an der Gelenkdestruktion. Bei Koimplantation von synovialen RA-Fibroblasten zusammen mit humanem Knorpel unter die Nierenkapsel von SCID-Mäusen heften sich die RA-Fibroblasten an den Knorpel und wachsen in ihn hinein, wobei sie ihr transformiertes Aussehen beibehalten (Müller-Ladner et al., 1996). An der Invasionsfront findet man eine erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 und eine verstärkte Produktion der Kathepsine L und B. In einem anderen Modell, bei dem erkranktes RA-Synovialgewebe direkt in Kniegelenke von SCID-Mäusen transferiert wird, kommt es nicht nur zur Knorpelschädigung, sondern auch zur lokalen Entzündung des Gelenkes (Sack et al., 1994). Inzwischen konnte gezeigt werden, daß auch *in vitro* kultivierte und mehrfach passagierte synoviale Fibroblasten aus arthritischen Gelenken verschiedener Spezies dieses destruktive Potential haben, Fibroblasten aus der Haut oder aus osteoarthritischem (OA)-Gewebe jedoch nicht (Müller-Ladner et al., 1996; Hückel et al., 2001). Bei Transfer von humanen synovialen Fibroblasten in SCID-Mäuse führte dies zu einem gemischten murinen/humanen Pannus (Kuhn et al., 1997). Es gibt Hinweise darauf, daß dabei eine xenogene Interaktion zwischen humanen Fibroblasten und murinen Makrophagen auftritt, die zur Freisetzung von Zytokinen wie z.B. TNF- α führt, welche maßgeblich an der Entwicklung der Arthritis beteiligt sein könnten (Lehmann et al., 2000).

Da in der RA die Zahl der Deckzellen drastisch erhöht ist, kann man Synoviozyten relativ einfach aus Explantaten gewinnen, indem man die Fibroblasten in einer Kulturschale auswachsen läßt. Die Monolayerkulturen aus solchem Gewebe sind in der Regel relativ heterogen, was darauf zurückzuführen ist, daß das Synovialgewebe ebenfalls heterogen und von vielen mononukleären Zellen infiltriert ist. In der Primärkultur der adhärierenden Zellen finden sich hauptsächlich Fibroblasten, Makrophagen und dendritische Zellen. Erst durch Passagierung geht die Anzahl an Makrophagen stark zurück und eine reine Fibroblastenkultur bleibt zurück. Nach Unemori et al. (1991) sind etwa nach der 2. Passage die Synoviozyten frei von Makrophagen. Allerdings ist dabei zu bedenken, daß im Verlauf der Kultur die Zellen morphologischen und biochemischen Veränderungen unterliegen, so daß deren funktionelle

Eigenschaften sich ändern können. Zimmermann et al. (2001) haben beim Vergleich von Primärkulturen mit Kulturen nach der 4. Passage eine Abnahme der MHC II-Expression und eine Zunahme von Prokollagen I und III sowie der Transkriptionsfaktoren cfos und junD nachgewiesen. Außerdem können die Zellen durch die Behandlung mit Trypsin bei der Passagierung geschädigt werden (Zschäbitz et al., 1988). Für vergleichende funktionelle Studien ist die Passagenanzahl daher in einem möglichst engen Bereich zu halten, um definierte Ausgangsbedingungen zu haben.

1.3 Zelluläre Interaktionen

Das entzündete Gelenkgewebe ist massiv mit immunkompetenten Zellen infiltriert. Dabei spielen die Wechselwirkungen der Immunzellen untereinander sowie mit residenten Zellen eine sehr wichtige Rolle (Abb.1). Sie beeinflussen sich wechselseitig durch lösliche Faktoren wie Interleukine und durch direkten Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakt. In der RA findet man daher nicht nur viele proinflammatorische Zytokine, sondern auch viele Adhäsionsmoleküle überexprimiert.

Viele Faktoren, die die Prozesse der Entzündung und Knorpeldestruktion realisieren, werden von Makrophagen gebildet. Insbesondere die Zytokine IL-1 β und TNF- α spielen nachweislich eine zentrale Rolle. Sie induzieren die Sekretion von MMP, welche sowohl von Makrophagen als auch von Synoviozyten und Chondrozyten gebildet werden und zum Knorpelabbau beitragen. Die Induktion der proinflammatorischen Mediatoren erfolgt vermutlich hauptsächlich durch die Wechselwirkung mit T-Zellen (Burger et al., 1998). So erfolgen die Destruktionsprozesse dort, wo T-Zellen in engen Kontakt zu Monozyten stehen, was auch darauf hindeutet, daß ein zelloberflächen-vermittelter Induktions-Mechanismus möglich ist. Wie bei der gegenseitigen Aktivierung von B- und T-Zellen, vermutet man auch bei der Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen die Involvierung von vielen Signal-Molekülen, die auch in Abwesenheit eines Antigens in beiden Zelltypen Effektor-Funktionen auslösen können. Die Beobachtung, daß für die Sekretion von IL-1 β aus Makrophagen ein direkter Kontakt mit anti-CD3-stimulierten T-Zellen notwendig ist, weist auf die Bedeutung von membran-gebundenen Faktoren hin. Auch andere proinflammatorische Faktoren wie NO, IL-6 und IFN- γ konnten in der Zellkultur durch direkten Kontakt zwischen T-Zellen und Makrophagen induziert werden (Lehmann, 2002). Die an den Zell-Zell-Interaktionen beteiligten Faktoren sind gegenwärtig Gegenstand intensiver Untersuchungen, da man sich erhofft, durch die Erkenntnis der genauen Mechanismen neue Therapiestrategien entwickeln zu können.

Einige Experimente weisen auf eine Beteiligung der kostimulatorischen Faktoren B7-1 und B7-2 an der Aktivierung von Makrophagen hin (Shimoyama et al., 1999). Jedoch kann auch die Expression des B7-Moleküls selbst einer Regulierung durch T-Zellen unterliegen. Des weiteren wird die Beteiligung der membrangebundenen Moleküle CD40/CD40L diskutiert (Grewal und Flavell, 1998). CD40-CD40L Interaktionen führen z.B. zur Induktion von IL-1 β in Monozyten (Ribbens et al., 2000). Auch Bindungen über die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, LFA-1 und CD69 konnten eine TNF- α -Produktion in Monozyten aktivieren (Burger und Dayer, 1998). Zusammenfassend kann man festhalten, daß die

Produkte, die in der Zielzelle induziert werden, von den stimulierenden Agenzien bzw. deren Zusammenspiel und dem Stimulierungszustand der T-Zellen abhängen (Burger und Dayer, 1998).

Darüber hinaus sind an der Pathogenese weitere wichtige Zellen beteiligt, z.B. Osteoklasten, die für die Knochenresorption verantwortlich sind, Neutrophile, die durch Elastasefreisetzung am Matrixabbau beteiligt sind, B-Zellen, die für die Produktion von autoreaktiven Antikörpern verantwortlich sind, Endothelzellen, die die Migration der Lymphozyten unterstützen und Chondrozyten selbst, die ebenfalls MMP freisetzen. Auf diese Zellen wird in dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen.

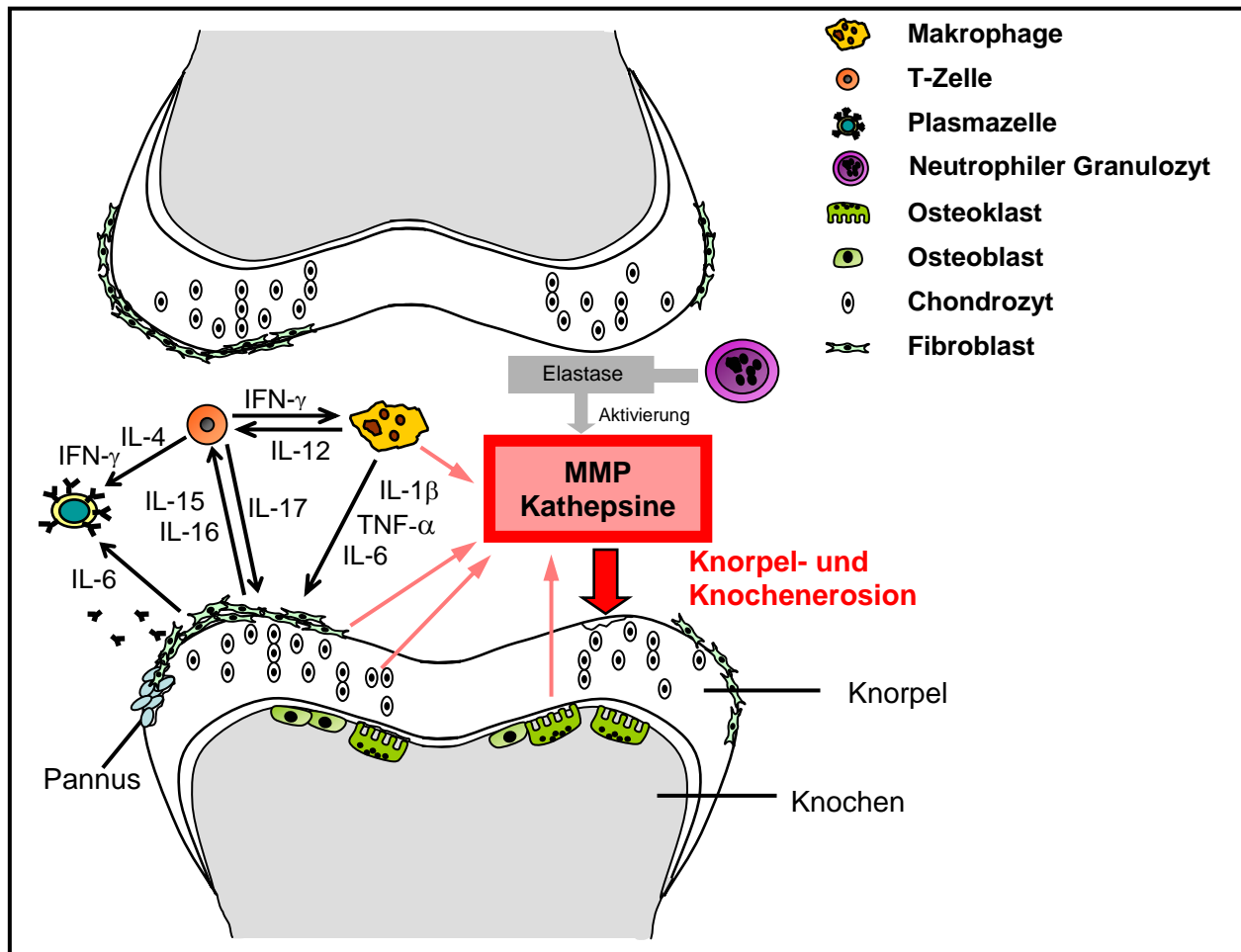


Abb. 1: Entzündungs- und Destruktionsprozesse in einem Gelenk mit Rheumatoider Arthritis

In den Gelenkspalt infiltrieren viele verschiedene Immunzellen wie T-Zellen, Makrophagen und Neutrophile Granulozyten. Sie setzen proinflammatorische Zytokine, Chemokine sowie Proteasen (z.B. Elastase) frei und treten sowohl untereinander als auch mit Synoviozyten in Wechselwirkung. Makrophagen unterstützen durch IL-12-Sekretion die Differenzierung der Th-Zellen zu Th1-Zellen. Th-Zellen stimulieren wiederum Makrophagen und B-Zellen über Zytokine. Das von Synoviozyten gebildete IL-16 wirkt chemotaktisch auf Th-Zellen. Synoviozyten beeinflussen auch die Aktivität der Th-Zellen z.B. über IL-15. Die synovialen Fibroblasten und ferner Chondrozyten und Osteoklasten werden zur Sekretion von knorpeldegradierenden Enzymen wie Matrixmetalloproteasen (MMP) und Kathepsinen stimuliert. Aktivierte Zellen verschiedenen Ursprungs invadieren den Knorpel und setzen besonders an der Invasionsfront Proteasen frei. Sie bilden das stark vaskuläre Pannusgewebe. Aktivierte Osteoklasten führen zum Knochenabbau.

Das RA-Gelenk ist gekennzeichnet durch eine stark verdickte synoviale Deckzellschicht, Vaskularisierungen und die Bildung von lymphozytären Aggregaten (in diesem Schema nicht dargestellt).

Die Interaktionen der T-Zellen mit den Synoviozyten werden erst seit kurzem genauer untersucht. Erste Studien von 1994 zeigten, daß aktivierte T-Zellen an Synoviozyten über ICAM-1 binden (McInnes et al., 2000). Es ist bekannt, daß der direkte Zellkontakt die Kollagen I- und III-Synthese in Synoviozyten vermindern kann (Rezzonico et al., 1998). Zur Untersuchung der Interaktionen zwischen diesen beiden Zelltypen auf der Ebene des direkten Zell-Zell-Kontaktes sind häufig fixierte T-Zellen oder Zellmembranen eingesetzt worden, so daß ein Signal nur in eine Richtung ausgelöst wurde. In Synoviozyten wurde dadurch nicht nur die Kollagensynthese inhibiert, sondern auch die MMP-Synthese angeregt (Burger et al., 1998). Für die Interaktionen zwischen T-Zellen und Synoviozyten werden neben Adhäsionsmolekülen besonders die membranständigen Zytokine TNF- α , IL-1 α und IFN- γ diskutiert (Burger et al., 1998; Rezzonico et al., 1998; McInnes et al., 2000). TNF- α und IL-1 α auf T-Zellmembranen sollen die Sekretion von MMP-1 und Prostaglandin E₂ (PGE₂) in Synoviozyten induzieren, während sie die Kollagensynthese hemmen (Dayer und Burger, 1999). Chizzolini et al. (1998) führten zudem membranständiges IFN- γ als inhibierenden Faktor der Kollagen I-Synthese an. Dayer und Burger (1999) wiesen darauf hin, daß zwischen Synoviozyten und T-Zellen vermutlich andere Aktivierungsmechanismen stattfinden als zwischen Makrophagen und T-Zellen. So läßt sich die Makrophagenaktivität durch Antikörper gegen CD69 oder CD11b inhibieren, die Synoviozytenaktivität jedoch nicht. Synoviozyten reagierten dagegen bei Stimulierung über CD40 mit einer verstärkten Proliferation (Rissoan et al., 1996). Synoviozyten werden darüber hinaus aber auch durch lösliche Zytokine von T-Zellen aktiviert (McInnes et al., 2000; Weyand, 2000). Durch TNF- α und IFN- γ werden die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 auf Synoviozyten erhöht (Bombara et al., 1993), welche wiederum eine stärkere Adhäsion der T-Zellen ermöglichen.

Es ist aber auch bekannt, daß Synoviozyten einen Einfluß auf T-Zellen ausüben können. So haben die Synoviozyten nicht nur die Funktion als abschließende Schutzschicht und als Strukturelement, sondern fungieren auch als sogenannte „Wächterzellen“, d.h. sie übernehmen immunregulatorische Aufgaben (Smith et al., 1997). Ruhende T-Zellen können z.B. durch synoviale Fibroblasten, nicht jedoch durch dermale Fibroblasten zur Proliferation angeregt werden, d.h. die Synoviozyten dienen bei der mitogenen Stimulierung der ruhenden T-Zellen als Accessory-Zellen (Yamamura et al., 2001). Boots et al. (1994) konnten nachweisen, daß Synoviozyten auch als Antigen-präsentierende Zellen (APZ) für Th-Zellen fungieren können, wenn sie zuvor mit IFN- γ stimuliert wurden. Diese Eigenschaft hängt vermutlich von der Expression des MHC II-Moleküls ab, das auf Synoviozyten durch IFN- γ induziert werden kann und das auf Synoviozyten im rheumatischen Gelenk auch verstärkt nachgewiesen werden konnte. Die T-Zellantwort ist allerdings nicht so stark wie die auf professionelle APZ. Die auf Synoviozyten exprimierten Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 könnten dabei als kostimulatorische Moleküle für T-Zellen fungieren (Konttinen et al., 2000; Yamamura et al., 2001).

Die in RA-Geweben geringer vorkommenden Apoptosemarker weisen auf eine gestörte Apoptoseregulierung hin. Eine Ursache hierfür könnte in der Fähigkeit der Synoviozyten liegen, die Apoptose von T-Zellen zu hemmen. Die Inhibierung der Apoptose wird vermutlich über IL-15, das von Fibroblasten sezerniert wird, ausgelöst (Salmon et al., 1997; Harada et al., 1999).

Weitere experimentelle Befunde sprechen dafür, daß lösliche Th1- und Th2-Zytokine Synoviozyten unterschiedlich beeinflussen können. So induziert proinflammatorisches IL-17 von humanen Th1-Zellen zusammen mit IL-1 β der Makrophagen in Synoviozyten die Produktion von IL-6, LIF und MMP-1 und damit das destruktive Potential dieser Zellen, während die Th2-Zytokine IL-4, IL-13 und in geringerem Maße auch IL-10 die Bildung proinflammatorischer Zytokine einschließlich IL-17 hemmen, die TIMP-Produktion steigern und dadurch die Matrixdestruktion verringern können (Chabaud et al., 1998; 1999). Corrigall et al. (2001) zeigten außerdem, daß Synoviozyten Rezeptoren für IL-2 exprimieren und auf IL-2 mit einer gesteigerten MCP-1-Produktion reagieren.

Da die RA mit einer verstärkten Th1-Antwort verbunden ist, während die Differenzierung zu Th2-Antworten in den Patienten scheinbar gestört ist (Davis et al., 2001), wird ein Zusammenhang zwischen den Th1-Zellen und der Chronifizierung der Krankheit vermutet. Wegen der antagonistischen Wirkungen der Th1- und Th2-Zellen erhofft man durch eine Verschiebung der Th1-Antwort zu einer Th2-Antwort eine Verminderung der Entzündung und damit auch indirekt eine Verminderung der Destruktion. Es gibt inzwischen aber schon einige Befunde, die diese einfache Gegenregulierung bezweifeln lassen (Muraille und Leo, 1998). So haben viele als proinflammatorisch bezeichnete Faktoren auch immunsuppressive Aufgaben, die im Gesamtgeschehen nicht vernachlässigt werden dürfen. Einige typische Beispiele hierfür sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Insbesondere die Rolle von IFN- γ , ein typisches Th1-Zytokin, ist sehr umstritten. Es gibt sowohl Hinweise auf deren Notwendigkeit bei der Induktion der Arthritis als auch auf protektive Wirkungen. Für die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) ist eine Verschlechterung der Symptome in IFN- γ Rezeptor (IFN- γ R)-defizienten und in IFN- γ -defizienten Mäusen beschrieben (Vermeire et al., 1997; Matthys et al., 1998, 1999, 2001a; Guedez et al., 2001). Dementsprechend gibt es auch Hinweise, daß extern zugeführtes IFN- γ die CIA verbessern kann (Nakajima et al., 1990). Es ist aber auch gegenteiliges in der Literatur zu finden (Mauritz et al., 1988; Kageyama et al., 1998). Boissier et al. (1995) wiesen darauf hin, daß die Funktion des IFN- γ vom Zeitpunkt des Krankheitsverlaufes abhängt: in der frühen Phase soll IFN- γ krankheitsfördernd wirken, während es in der späten Phase protektiv wirke. Dagegen spricht jedoch, daß die CIA selbst in sonst nicht-suszeptiblen C57BL/6-Mäusen induzierbar ist, wenn die Mäuse eine IFN- γ -Defizienz aufweisen (Guedez et al., 2001). Die Entstehung der CIA in IFN- γ -oder IFN- γ R-defizienten Mäusen wird auf Faktoren wie starke Myelopoiesis, Expansion von Mac-1-Zellen (Matthys et al., 2001a), erhöhtes IL-12 (Matthys et al., 1998), chemotaktische Wirkung von SDF-1 (Matthys et al., 2001b) sowie auf eine erhöhte IL-1 β -Expression (Guedez et al., 2001) zurückgeführt. Auch ein Mangel an NO, welches normalerweise durch IFN- γ induziert wird, stand im

Verdacht, eine verstärkte Zell-Proliferation ausgelöst zu haben, wie es für die EAE beschrieben worden ist (Willenborg et al., 1999). Vermeire et al. (2000) konnten allerdings durch Hemmung der NO-Synthese bei der CIA in DBA/1 Mäusen keine Verschlimmerung der Krankheit nachweisen. Dies spricht gegen eine Vermittlung der protektiven Wirkung des IFN- γ über NO.

Untersuchungen im Modell der Proteoglykan-induzierten Arthritis konnten im Gegensatz zur CIA nur eine schwache Arthritis in IFN- γ -defizienten Mäusen induzieren (Kaplan et al., 2002). Es müssen hier also noch andere Faktoren eine Rolle spielen, die bisher nicht betrachtet wurden. Die Rolle von IFN- γ für die Interaktionen zwischen T-Zellen und Synoviozyten wird in dieser Arbeit daher auch gezielt untersucht.

Tab. 1: Pleiotrope Funktionen von Zytokinen, denen gewöhnlich immun- und entzündungs-fördernde Eigenschaften zugeschrieben werden (nach O'Shea, Ma und Lipsky 2002)

Zytokin	Immunstimulierende Funktionen	Immunsuppressive Funktionen
IL-2	<ul style="list-style-type: none"> - fördert T-Zellproliferation - hemmt Apoptose über Bcl2 und Bcl-XL Steigerung - wirkt zytotoxisch - stimuliert proinflammatorische Zytokine 	<ul style="list-style-type: none"> - notwendig für Th2-Differenzierung - notwendig für Entwicklung von immunregulatorischen Zellen - fördert Apoptose über Fas-FasL
TNF-α	<ul style="list-style-type: none"> - aktiviert APZ - aktiviert Endothelzellen - aktiviert Neutrophile - induziert Zytokine wie IL-1β und IL-6 	<ul style="list-style-type: none"> - inhibiert T-Zell-Signalling - fördert Apoptose - supprimiert Lymphombildung - inhibiert Kostimulation von Dendritischen Zellen - induziert Zytokine, die die zelluläre Immunantwort supprimieren
IFN-γ	<ul style="list-style-type: none"> - aktiviert Makrophagen - verstärkt Antigen-Präsentation - fördert Th1-Differenzierung 	<ul style="list-style-type: none"> - Anti-proliferative Effekte auf lymphoide und myeloide Zellen - Hochregulierung von suppressor of cytokine signalling 1 (SOCS1)
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> - unterstützt Th1-Differenzierung - fördert T-Zellproliferation - induziert „Akute-phase Response“ - induziert Ig-Produktion in B-Lymphozyten 	<ul style="list-style-type: none"> - fördert Th2-Differenzierung - induziert antiinflammatorisches TGF-β - senkt Expression von IL-1β, TNF-α und Chemokinen

1.4 Degradationsprozesse im Gelenkknorpel

Die Struktur des Gelenkknorpels ist so beschaffen, daß sie hohen Druck- und Scherkräften Stand halten kann. Aus diesem Grund ist der Knorpel aus sehr elastischem, aber auch sehr stabilem Gewebe aufgebaut, das bis zu 80 % Wasser enthält. Kollagenfibrillen sorgen insbesondere für Zugfestigkeit, während das aus Proteoglykanen aufgebaute Aggrekan (s. Abb.2) als Makromolekül zur Reversibilität von Deformierungen beiträgt. Da das Aggrekan durch einen hohen Gehalt an Glucosaminoglykanen (GAG) viele dissoziierte COOH- und SO₄-Gruppen aufweist, hat es einen polyanionischen Charakter. Dadurch wird die Bindung von positiv geladenen Molekülen (Proteinen) sowie von Wasser ermöglicht, was zu einem definierten Quelldruck führt. Über Link-Proteine bindet eine große Zahl von Aggrekanen mit ihrer Domäne G1 nicht-kovalent an die lineare Hyaluronsäure, wodurch große Aggrekan-Aggregate entstehen. Ferner kommen noch viele nichtaggregierende Proteoglykane im Knorpel vor. In den Knorpel eingebettet sind Chondrozyten, die die extrazelluläre Matrix bilden. Als Gelenkschmiere fungiert die Synovialflüssigkeit, die einen hohen Anteil an Hyaluronsäure mit viskoelastischen Eigenschaften enthält. Diese wird im wesentlichen von den synovialen Fibroblasten produziert.

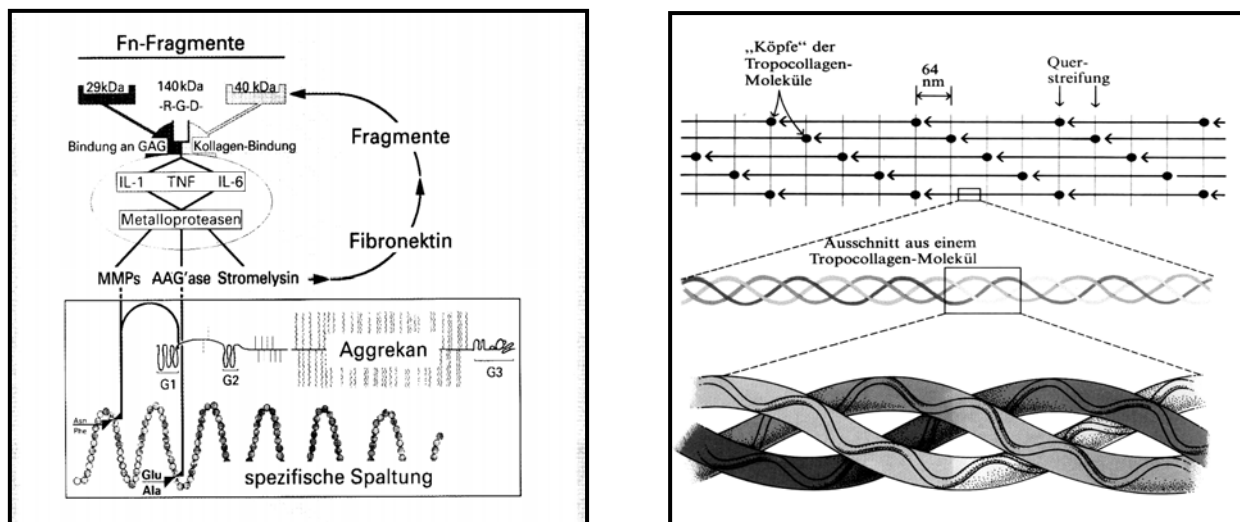


Abb.2: Struktur der Aggrekan-Aggregate und des Kollagen Typ II (nach Otte, 2000)

Links: An einem sogenannten Core-Protein mit einem Molekulargewicht von 220000 Da sind etwa 100 Chondroitinsulfat-, 20-30 Keratansulfatketten und verschiedene Oligosaccharide gebunden und bilden zusammen ein Aggrekanmolekül. Das Core-Protein besitzt 3 globuläre Domänen. In der interglobulären Domäne (IGD) zwischen G1 und G2 finden die proteolytischen Angriffe durch MMP zwischen Asn³⁴¹ und Phe³⁴² oder Aggrekanasen zwischen Glu³⁷³ und Ala³⁷⁴ statt.

Rechts: Drei α 1-Ketten bilden als Tripelhelix das Kollagen-Molekül. Durch versetzte Aneinanderlagerung von Kollagenmolekülen tritt eine Querstreifung in den so zusammengefügt Mikrofibrillen auf. Die Mikrofibrillen lagern sich wiederum zu großen Fibrillen an, wobei auch Kollagen Typ XI eingelagert wird.

Proteoglykane sind jedoch nicht nur am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt, sondern üben noch verschiedene andere Funktionen aus (Fischer, 1992):

- Zell-Adhäsion
- Zell-Differenzierung
- Zell-Proliferation
- Zell-Migration
- Bindung von Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren und damit Funktion als Speicher oder Carrier
- Schutz von Wachstumsfaktoren vor proteolytischem Abbau
- Beteiligung an Gerinnungsmechanismen (durch Bindung von Heparin an Antithrombin).

Den Hauptbestandteil kollagener Proteine im Knorpel stellt das Kollagen vom Typ II dar, während Typ I Kollagen in Knochen, Sehnen und der Haut vorkommt. Das Kollagen Typ II wird aus einer Tripelhelix von drei identischen $\alpha 1(\text{II})$ -Ketten gebildet, die sich zu Fibrillen zusammenlagern (Abb.2). Quervernetzungen zwischen den Molekülen innerhalb der Fibrille tragen zur Stabilität bei. In die Knorpelfibrillen ist Kollagen Typ XI eingelagert, während Kollagen Typ IX an der Oberfläche der Fibrillen assoziiert ist und kovalente Quervernetzungen (Crosslinks) zwischen den Fibrillen ausbildet.

Bei der RA treten verschiedene Prozesse auf, die zu einem enzymatischen Angriff auf intaktes Knorpelgewebe führen. An der Degradation sind im wesentlichen Kathepsine, Matrixmetalloproteasen (MMP), Aggrekanasen und Elastasen beteiligt, die meist durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α im Gelenk induziert werden. Die Abbauprodukte der Matrix wiederum können die Entzündungs- und Degradationsprozesse aufrecht erhalten oder weiter forcieren. Zum Beispiel induzieren Hyaluronsäurefragmente die NO-Synthese in Makrophagen (McKee et al., 1997), Fibronektinfragmente induzieren Kollagenase in Fibroblasten (Damsky et al., 1992; Tremble et al., 1992) und Chondrozyten (Yasuda und Poole, 2002) sowie Stromelysin-1 in Chondrozyten (Bewsey et al., 1996). Kollagenfragmente wiederum können zur Steigerung der Gelatinaseaktivität und zur Inhibierung der Kollagensynthese sowie der Zelladhäsion beitragen (Jennings et al., 2001). Degradationsprodukte können darüber hinaus auch chemotaktisch auf Monozyten wirken (Ohnishi et al., 1998).

Die involvierten Enzyme stehen hierbei in enger wechselseitiger Beziehung. Die meisten Enzyme werden als inaktive Proformen sezerniert und erst durch proteolytische Abspaltung eines Propeptides aktiviert. Dies kann zum einen autokatalytisch erfolgen, wird aber meistens durch andere Proteasen bewerkstelligt. Auch bestimmte Inhibitoren werden gespalten und damit inaktiviert, so daß der Degradationsprozess noch zusätzlich vorangetrieben und so das Ungleichgewicht von Inhibitoren zu Proteasen immer mehr verstärkt wird. In Abb.3 sind die wichtigsten Aktivierungskaskaden dargestellt.

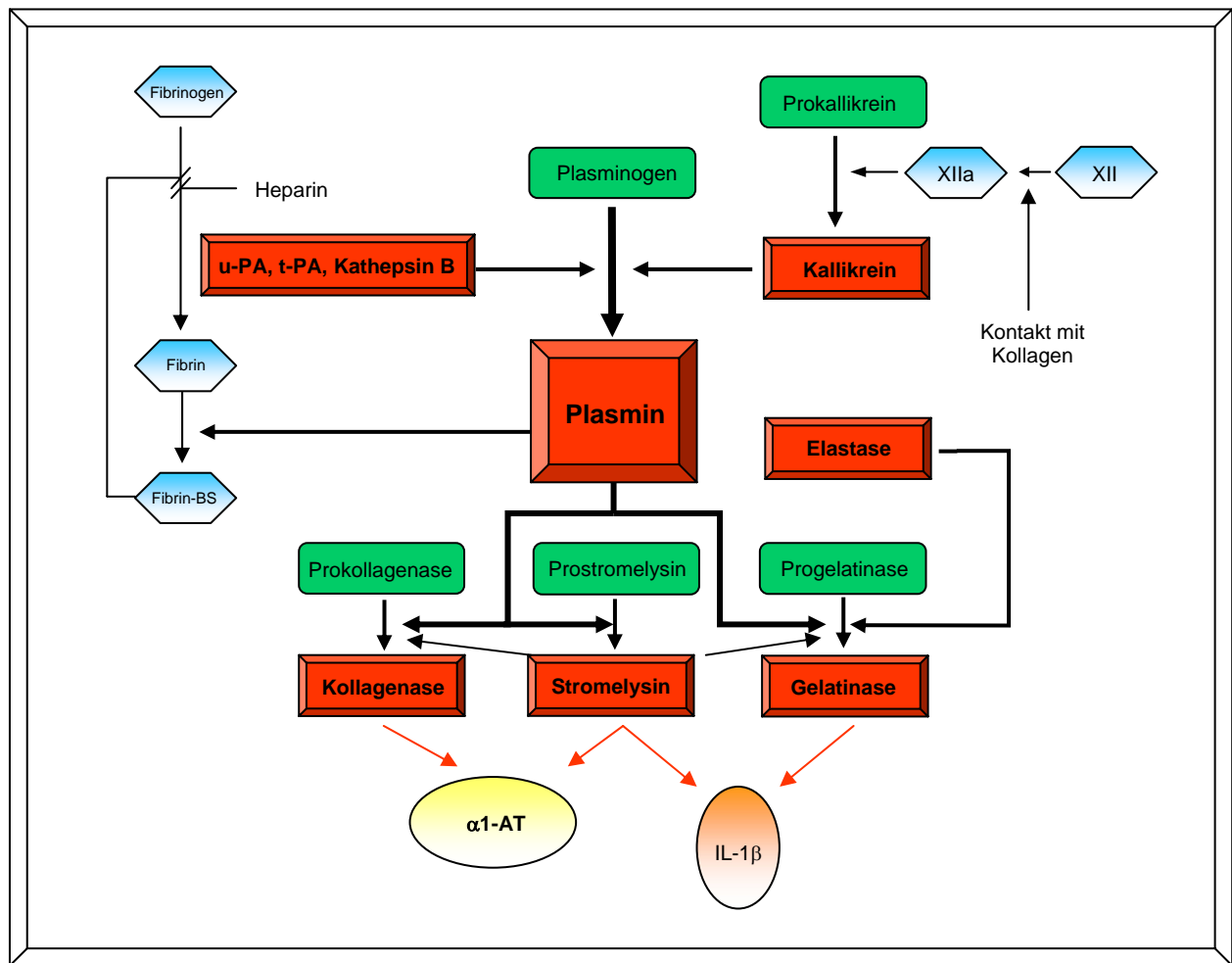


Abb. 3: System der Enzyme im Destruktionsprozeß (modifiziert nach Otte 2000)

Die Aktivierung der Matrixmetalloproteasen (Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen) erfolgt über eine Kaskade verschiedener Enzyme, wobei Plasmin eine zentrale Rolle spielt. Die Aktivierungen können aber auch alternativ über andere Proteasen wie Kathepsin B, Elastase oder Urokinase stattfinden. MMP können sich auch gegenseitig aktivieren und durch Proteolyse von Inhibitoren ihren Aktivierungsprozeß regulieren. Durch Degradation von IL-1 β kann aber auch ein negativer Feedback ausgelöst werden. (PA = Plasminogen activator, u-PA = urokinase-type PA, t-PA = tissue-type PA, α 1AT = α 1-Antitrypsin, XII = Gerinnungsfaktor XII, Fibrin-BS = Fibrinbruchstücke)

Für Plasmin läßt sich dabei eine zentrale Rolle erkennen, jedoch gibt es genügend alternative Wege, die zur Degradation führen können. Im Tiermodell mit t-PA (tissue-type plasminogen activator)- und u-PA (urokinase-like plasminogen activator)-defizienten Mäusen konnte deshalb auch keine Verbesserung der Arthritis nachgewiesen werden, im Gegenteil, es kam sogar zur Exazerbation, die sich vermutlich auf eine gestörte Fibrinolyse zurückführen läßt (Yang et al., 2001). Fibrinablagerungen werden bei der RA verstärkt nachgewiesen und können Entzündungsvorgänge fördern (Busso et al., 1998). Auch andere Studien mit Inhibitoren gegen MMP führten bisher nicht zum erhofften Erfolg. Es ist vermutlich auch deshalb schwierig, in dieses System einzugreifen, weil die proteolytischen Enzyme noch viele weitere Funktionen ausüben: Freisetzung und Aktivierung von Faktoren wie TGF- β , FGF, VEGF und IL-1 β , Inaktivierung von Inhibitoren (z.B. Serpine), Zellmigration, Wundheilung, Angiogenese, Ovulation, Spermareifung, Fibrinabbau, Knochen-

wachstum u.v.m.. Auch das Verhältnis der Proteasen zu ihren Inhibitoren ist entscheidend, wobei die Inhibitoren nicht nur bei der Hemmung, sondern beispielsweise für MMP-2 und TIMP-2 auch im Aktivierungsprozeß eine Rolle spielen können. Außerdem beeinflussen noch andere Parameter die Aktivierungs- und Inhibierungsprozesse. Wie am Beispiel der Aktivierung von Faktor XIIa durch Kontakt mit Kollagen gezeigt, können Matrixbestandteile selbstregulierend eingreifen. Kollagen wird auch eine wichtige Funktion bei der Regulierung der membranständigen MT1-MMP- und der MMP-13-Expression sowie der MMP-2-Aktivierung zugesprochen (Ruangpanit et al., 2002; Wernicke et al., 2002). ROS (reactive oxygen species) führen nicht nur selbst zur Depolymerisierung von Proteoglykanen, Hyaluronsäure und Kollagenen, sondern können durch Oxidation oder Glycosylierung von Inhibitoren oder Proteasen diese resistent gegen proteolytischen Verdau machen oder in ihrer Funktion beeinträchtigen. Das Radikal NO, ein hochreaktives Molekül, kann die MMP-Aktivität potenzieren und durch Hemmung der Expression des IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1RA) indirekt an der Regulierung der MMP-Expression teilnehmen. Reparaturmechanismen im Knorpel führen zwar teilweise zur Regenerierung der Proteoglykane, jedoch führt der Abbau von Kollagen zu irreversiblen Schäden in den Gelenken, und Fibrose ist eine häufige Folge. Nach heutigem Kenntnisstand ist zum Abbau der helikalen Struktur der Kollagene außer den Kollagenasen aus der Gruppe der MMP auch Kathepsin K fähig.

Die MMP, die zur Familie der Zink-Metallo-Endopeptidasen gehören, lassen sich anhand ihrer Substratspezifität in verschiedene Gruppen einteilen. Die drei großen Gruppen der MMP sind Kollagenasen, Gelatinasen und Stromelysine. Die Stromelysine (MMP-3, -10 und -11) haben ein sehr breites Substratspektrum. Sie spalten u.a. die Quervernetzungen der Kollagenfibrillen. Kollagenasen greifen die helikalen Kollagenfasern an, welches eine Entwicklung der Fibrillen zu nicht-helikalen Gelatinederivaten zur Folge hat, die dann weiter von Gelatinasen abgebaut werden können. Diese „Lockerung des Gewebes“ führt möglicherweise auch zum Verlust der Bindungsfähigkeit der Hyaluronsäure (Dahlberg et al., 2000). Dadurch wird die für die Elastizität notwendige Hyaluronsäure und das an ihr gebundene Aggrekan frei. Aggrekan selbst wird durch MMP gespalten, welches durch die bei der spezifischen Spaltung entstehenden Epitope VDIPEN nachgewiesen wurde. Ferner sind Spaltungsepitope zu finden, die der Aktivität einer Aggrekanase, einem Mitglied der ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif)-Familie, zugeschrieben wird (Yamanishi et al., 2002). Auch andere Enzyme wie Serinproteasen, hier insbesondere die Elastase und Kathepsine, besitzen Degradationsaktivität. Alles zusammen führt schließlich zur Instabilität des Knorpelgewebes.

Die MMP werden von Zellen als latente Proformen sezerniert. Ihre Struktur ist in Abb.4 dargestellt. Das Propetid, das für die Aktivierung der MMP abgespalten werden muß, befindet sich am N-Terminus und enthält ein Cystein, das mit dem Zink in der katalytischen Domäne interagiert und somit deren Aktivität hemmt. Bei Abspaltung des Propeptids kommt es zum sogenannten Cystein-Switch, was eine Aktivierung des Enzyms zur Folge hat (Abb.5). Die Spaltung kann über Proteasen oder durch

Quecksilberverbindungen erfolgen. Bis auf MMP-7 (Matrilysin) besitzen alle MMP noch eine Hemopexin-ähnliche Struktur, die zur Substratbindung und zur katalytischen Spezifität des Enzyms notwendig ist. Membrangebundene MMP enthalten zusätzlich eine Membrandomäne und werden neben MMP-11 als einzige MMP intrazellulär durch Furin-ähnliche Proteasen aktiviert.

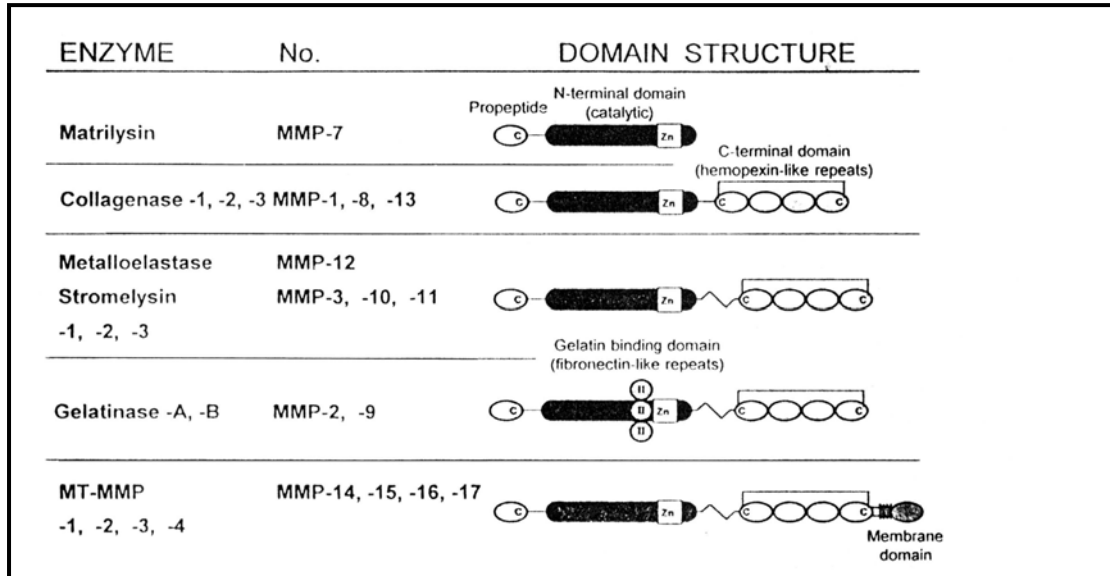


Abb. 4: Domänen-Struktur der verschiedenen MMP-Gruppen (nach Murphy und Knäuper, 1997)

MMP sind aus einem Propeptid, einer katalytischen Domäne mit dem zinkhaltigen katalytischen Zentrum und (bis auf MMP-7) einer Hemopexin-like Domäne, die eine Affinität zum Substrat aufweist, aufgebaut. Die membranständigen MT-MMP haben zusätzlich eine Membran-Domäne.

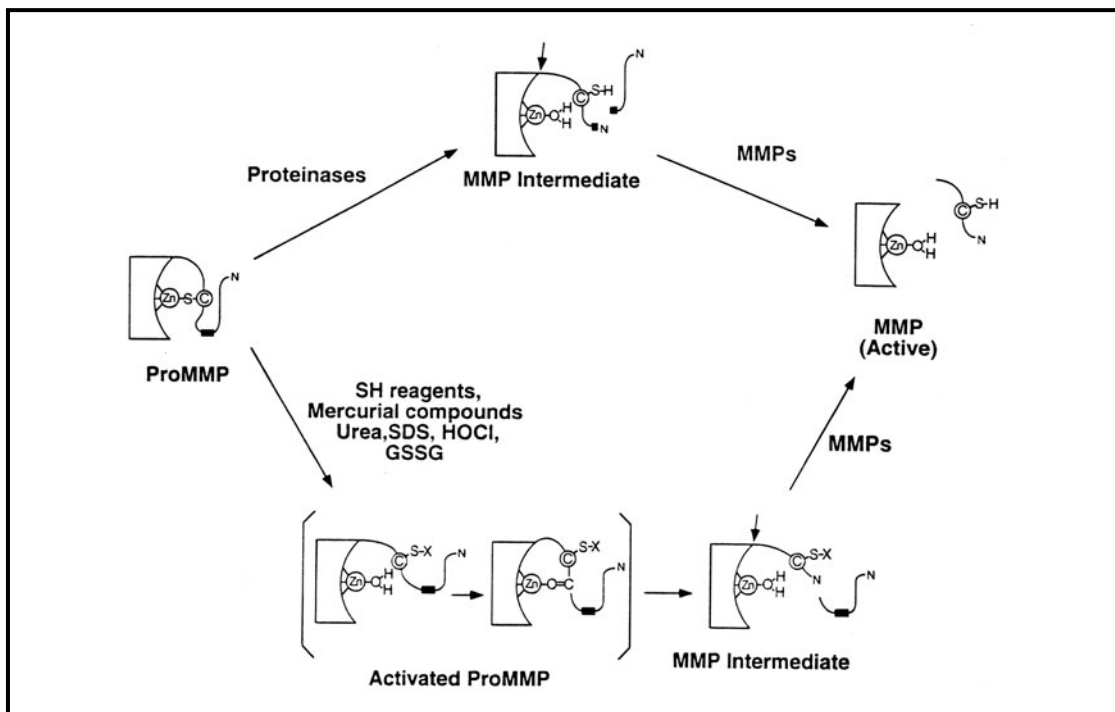


Abb. 5: Aktivierungsmechanismen der MMP (nach Nagase, 1997)

Durch Abspaltung des Propeptides werden MMP aktiviert. Die Spaltung kann im ersten Schritt entweder enzymatisch (oberer Weg) oder chemisch (unterer Weg) induziert werden, der 2. Schritt kann autokatalytisch erfolgen. In beiden Fällen wird die Bindung der SH-Gruppe eines Cysteins zum katalytischen Zink aufgehoben (Cystein-Switch)

1.5 Zielstellung

Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) dominieren T-Helferzellen des Th1-Typs. Ihre Rolle bei der lokalen Entzündung und den Knorpelabbauprozessen im Gelenk ist jedoch noch relativ unklar. Auch über Mechanismen der Gegenregulierung durch andere Th-Zellsubpopulationen ist bisher wenig bekannt. Deshalb sollte in dieser Arbeit der Einfluß verschiedener Th-Subpopulationen auf Synoviozyten *in vitro* untersucht werden. Mit den Kenntnissen über die Mechanismen der Zell-Zell-Interaktionen von Th-Subpopulationen und Synoviozyten sollten Wege gefunden werden, in diese Mechanismen regulatorisch einzugreifen. Gezielte Modulationen der zellulären Interaktionen oder von Th-Subpopulationen bieten möglicherweise neue therapeutische Ansatzpunkte der RA.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Interaktionen von Synoviozyten mit Th-Zellen und ihren Subpopulationen *in vitro* in einem Kokultursystem zu charakterisieren. Desweiteren sollte die Modulierbarkeit der Wechselwirkungen durch Zytokin-Zusätze untersucht werden.

Dazu wurden folgende Versuchsansätze mit Zellen aus C57BL/6-Mäusen mit Antigen-induzierter Arthritis (AIA) als experimentelles Arthritismodell geplant:

- *Kultivierung von Synoviozyten mit Th-Zytokinen*

Welchen Einfluß haben lösliche Th-Zytokine auf die MMP-, NO- und Zytokin-Sekretion in stimulierten und unstimulierten Synoviozyten aus arthritischen und normalen Gelenken?

- *Kokultur von Synoviozyten mit CD4⁺ und CD4⁻ T-Zellen*

Führen CD4⁺ Th-Zellen zu einer stärkeren Stimulierung der Synoviozyten als CD4⁻ T-Zellen?

- *Einfluß der Synoviozyten auf die T-Zellaktivität*

In wie weit induzieren oder hemmen Synoviozyten die Zytokinsekretion in verschiedenen T-Zell-Populationen? Ist die Wirkung abhängig vom direkten Zellkontakt, von der Art der Synoviozyten oder der T-Zellaktivität?

- *Einfluß verschiedener Th-Subpopulationen auf Synoviozyten*

Beeinflussen Th1-Zellen Synoviozyten stärker als Th2-Zellen und sind daran membranständige Faktoren beteiligt? Dazu sollten Th-Subpopulationen zum einem *in vitro* aus naiven T-Zellen generiert werden und zum anderen *ex vivo* aus arthritischen Tieren durch Separation anhand des membrangebundenen IFN- γ gewonnen werden.

- *Kokultur mit T-Zellen aus TNF- α -knockout Tieren*

Inwieweit ist löslicher oder membrangebundener TNF- α von T-Zellen an der Aktivierung der Synoviozyten beteiligt?

- *Modulation der Kokultur durch Zytokinzusätze*

Läßt sich durch IFN- γ - oder IL-4-Zusatz eine Verschiebung der Th-Subpopulation in der Kokultur erreichen und hat dies eine Veränderung der Synoviozyten-Aktivierung zur Folge.

2. MATERIAL UND METHODEN

Alle Marken- und Produktnamen sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Hersteller.

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank Cellstar, NUNC, Wiesbaden
Durchflussszytometer FACScan, BECTON DICKINSON, Heidelberg
Dynal Magnetic Particle Concentrator, DYNAL BIOTECH, Hamburg
ELISA-Reader EAR 400FT, SLT, LABINSTRUMENTS DEUTSCHLAND, Crailsheim
Elektrophorese Einheit, BIORAD, München
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, FEINOPTIK, Bad Blankenburg
Fluoreszenz-Reader Fluostar Galaxy, BMG, Offenburg
Inverses Mikroskop Telaval 3, CARL ZEISS, Jena
Kolbenhubpipetten in verschiedenen Größen, EPPENDORF, Hamburg
Kryostat HM 500M, MICROM LABORGERÄTE GMBH, Walldorf
Kühlzentrifuge Jouan CR312, JUAN, Unterhaching
Laminarflowbox, ELEKTROMAT, Dresden
Mehrkanalpipetten, EPPENDORF
MidiMACS Separationseinheit, MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach
Mikroskop Axioskop 2, CARL ZEISS
Oditest Schnelltester, KRÖPLIN, Schlüchtern
Pipettierhilfe, HIRSCHMANN LABORGERÄTE, Eberstadt
Präparationsbesteck, AESKULAP, Tuttlingen
Tischzentrifuge 30F, HETTICH, Tuttlingen
Tischzentrifuge Biofuge 13, HERAEUS, Hanau
Vortexgerät VF2, IKA-LABORTECHNIK, Stauben i.Br.
Vakuumzentrifuge SpeedVac Sarvant-SC110, THERMOQUEST, Egelsbach
Waschgerät Columbus, SLT LABINSTRUMENTS DEUTSCHLAND
Wasserbad mit Thermostat, JULABO, Seelbach

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Chamberslides, NUNC
Einmalfilter 0,2 µm, steril, pyrogenfrei, SCHLEICHER&SCHÜLL, Dassel
Einmalspitzen, verschiedene Größen, EPPENDORF
Einmalspritzen und -kanülen, BRAUN MELSUNGEN, Melsungen
Einmalstangenpipetten in verschiedenen Größen, GREINER, Nürtingen
Eppendorfbehälter, EPPENDORF
FACS Röhrchen, FALCON, Gräfeling-Locharn
Gewebekulturflaschen, GREINER
Gewebekulturplatten 6-Well, 12-Well, 24-Well, 96-Well, GREINER
Gewebekulturplatten 24-Well, COSTAR, Bodenheim

Gewebekulturplatten 6-Well, Biocoat Cellware Variety Pack I, BECTON DICKINSON
 Transwell-Membraneinsätzen (0,1 µm; Ø 6,5 mm), COSTAR
 Kryo-Röhrchen, steril, GREINER
 MidiMACS LS-Separationssäulen, MILTENYI BIOTEC
 Mikrotiterplatten, hochbindend für ELISA, NUNC
 Microlon FIA-Platten, 96-Well, schwarz, GREINER
 Objektträger und Deckgläser, MENZEL, Braunschweig
 Petrischalen, 100/20 mm, steril, unbehandelt, GREINER
 Polystyrol-Röhrchen (PS), 14 ml (17/100 mm), steril, GREINER
 Polypropylen-Röhrchen (PP), 50 ml , steril, GREINER

2.1.3. Medien, Puffer und Reagenzien

2.1.3.1 Kulturmedien und Puffer

KOMPLETTE MEDIEN

Medium für Kultur von T-Zellen und mononukleären Zellen:

RPMI1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, USA), supplementiert mit:

Streptomycin (Grünenthal, Stolberg)	0,1 mg/ml
Penicillin-G (Jenapharm, Jena)	100 U/ml
Glutamin (Gibco)	2 mM
Hepes (Gibco)	10 mM
Natriumpyruvat (Gibco)	1 mM
2-Mercaptoethanol (Gibco)	0,05 mM
FCS (Gibco)	10 %

Medium für Synoviozyten-Kultur:

DMEM (Gibco), supplementiert mit:

Streptomycin (Grünenthal)	0,1 mg/ml
Penicillin-G (Jenapharm)	100 U/ml
Glutamin (Gibco)	2 mM
Hepes (Gibco)	10 mM
Natriumpyruvat (Gibco)	1 mM
FCS (Gibco)	10 %

Medium für B9-Zellen (IL-6-Bioassay):

RPMI 1640 (Gibco)	60 %
Iscove'sches Medium (Gibco)	30 %
FCS (Gibco)	10 %
Streptomycin (Grünenthal)	0,1 mg/ml
Penicillin-G (Jenapharm)	100 U/ml
Glutamin (Gibco)	4 mM
2-Mercaptoethanol (Gibco)	0,05 mM

Medium für die Kokulturen:

komplettes DMEM ohne FCS

PUFFER FÜR ZELLSEPARATIONEN

MACS-Puffer:

FCS (Gibco)	3 %
EDTA (Sigma, Steinheim)	2 mM

gelöst in PBS

PUFFER FÜR FACS-ANALYSEN

FACS-Puffer :

FCS (Gibco)	3 %
NaN ₃ (Serva)	0,1 %

gelöst in PBS

Saponin-Puffer :

Saponin (Sigma)	0,5 %
-----------------	-------

gelöst in FACS-Puffer

PUFFER FÜR ELISA-BESTIMMUNG

Beladungspuffer:

Na-CO: Natriumcarbonatpuffer (Sigma): 100 mM pH 9,5
 Na-PP: Natriumphosphatpuffer (Sigma): 100 mM, pH 9,0
 Na-PP: Natriumphosphatpuffer (Sigma): 200 mM, pH 6,5

Blockierungspuffer:

BSA (Sigma)	3 % in PBS
-------------	------------

Waschpuffer:

Tween 20 (Sigma)	0,05 % in PBS
------------------	---------------

Assay-Puffer :

BSA (Sigma)	1 %
Tween 20 (Sigma)	0,05 %

in PBS

2.1.3.2 Reagenzien

GRIESS-REAGENZ

H ₃ PO ₄ (Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz)	2,5 %
Sulfanilamid (Fluka)	1 %
N-(1-Naphtyl)ethylendiamindihydrochlorid (Fluka)	0,1 %

SUBSTRAT-LÖSUNG FÜR PEROXIDASE-REAKTION im ELISA UND ZELL-ELISA

2 mg/ml OPD in 100 mM Zitratpuffer; pH 4,8 mit 3 % H₂O₂ (frisch hergestellt)

WEITERE CHEMIKALIEN

PMA, Ionomycin, Monensin, mBSA, BSA, LPS, EDTA, APMA und Casein sind von Sigma

Gelatine Merck

Coomassie-Blau G250 Serva

Stimulanzien und weitere spezielle Chemikalien sind im Kapitel 2.2 Methoden aufgeführt

.

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Für die Gewinnung der Synoviozyten und T-Zellen wurden 8-12 Wochen alte weibliche Inzucht-C57BL/6-Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden im Alter von ca. 6 Wochen vom Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena bezogen. Sie wurden unter Standardbedingungen bei einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus mit Standard-Diätpellets (Altromin, Lage) und Wasser *ad libitum* gehalten.

Für die Gewinnung von TNF- α -defizienten Th-Zellen wurden CD4⁺ Th-Zellen aus TNF- α -defizienten C57BL/6 Mäusen (Körner et al., 1997a und 1997b) isoliert.

2.2.2 Antigen-induzierte Arthritis

Die C57BL/6-Mäuse wurden 21 Tage vor Arthritisinduktion mit 100 μ g mBSA, in einer Emulsion aus 50 μ l Saline und 50 μ l komplettem Freund'schen Adjuvans (Sigma) – supplementiert mit 2 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (DIFCO), subkutan in die rechte Flanke immunisiert. Eine zweite Immunisierung erfolgte 14 Tage vor Auslösen der Arthritis dorsal in die Schwanzwurzel. Zu beiden Immunisierungszeiten wurden zusätzlich *intraperitoneal* 10⁹ hitzeinaktivierte *Bordetella pertussis*-Keime (Chiron Behring, Marburg) injiziert.

Am Tag 0 wurde die Arthritis unter Äthernarkose durch intraartikuläre Injektion von 100 μ g mBSA in 25 μ l Saline in das rechte Kniegelenk ausgelöst. Die Tiere wurden am Tag 7 der AIA durch einen Schnitt durch die Karotis ausgeblutet und durch zervikale Dislokation getötet. Die ipsilateralen Kniegelenke wurden für die Synoviozytenpräparation verwendet, die Milzen und Lymphknoten für die T-Zellgewinnung steril entnommen.

Durch systemische Applikation des Antigens können im Verlauf der chronischen Arthritis akute Exazerbationen ausgelöst werden. Dazu wurden am Tag 21 nach Induktion der primären Arthritis 300 μ g mBSA (3 mg/ml in isotonischer Kochsalzlösung) intravenös gespritzt. Am Tag 23 wurden Milzen und Lymphknoten für die Gewinnung von Th-Zellen steril entnommen.

2.2.3 Präparation der Synoviozyten

Synoviozyten wurden aus Kniegelenken von gesunden oder arthritischen (ipsilaterales Gelenk) C57BL/6-Mäusen mit 7 Tagen AIA gewonnen. Die Gelenke wurden wie folgt präpariert: Die Patella wurde separat herausgeschnitten und in einer 24-Well Kulturplatte in komplettem DMEM mit 20 % FCS kultiviert. Von den zwei Gelenkköpfen (Tibia und Femur) wurden Binde-, Fettgewebe und Knochen größtenteils entfernt, so daß das Synovium frei vorlag. Dieses Gewebe wurde ebenfalls in einer 24-Well Kulturplatte für 7 Tage kultiviert, währenddessen die Synoviozyten aus dem Gewebe auswuchsen.

Alternativ wurden für einige Versuche Synoviozyten eingesetzt, die durch enzymatischen Verdau gewonnen wurden. Dazu wurde das Gewebe wie beschrieben präpariert und dann mit 0,1 % Trypsin (Roche) 30 min bei 37 °C verdaut, anschließend mit DMEM gewaschen und mit 0,1 % Collagenase P (Boehringer, Mannheim) 2 h bei 37 °C verdaut. Daraufhin wurden die angedauten Gewebeteile mit

einem Spritzenstempel auf einem Metallsieb zerrieben und die Zell-Suspension von restlichen Gewebeteilen getrennt. Die Zellen wurden nochmals gewaschen und in DMEM komplett + 20 % FCS kultiviert.

Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in 5%-iger CO₂ Atmosphäre. In den ersten 7-8 Tagen wurde das Medium jeden Tag erneuert. Nach 7 Tagen wurden Gewebereste aus der Kultur entfernt und nach weiteren 1-2 Tagen wurden die Synoviozyten passagiert. Dazu wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und dann für 2-4 min bei 37 °C mit 0,25 % Trypsin (Gibco) / 0,02 % EDTA (Sigma) in PBS inkubiert. Die Zellen wurden abgenommen, in FCS-haltigem DMEM gewaschen und in neue Kulturplatten ausgesät. Die weitere Kultivierung erfolgte nun in DMEM mit 10 % FCS. Sobald sich ein subkonfluenter Zellrasen gebildet hatte (3-6 Tage), wurden die Zellen erneut passagiert. Sowohl für die Kokultur als auch für die Transferversuche wurden die Zellen nach der 3. bis 5. Passage verwendet. Wurden die Zellen nicht unmittelbar für Versuche eingesetzt, sind sie in Kryoröhrchen in 10 % DMSO-haltigem Medium für 24 h mit Isopropanol langsam auf -70 °C runtergekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert worden.

2.2.4 Präparation der T-Zellen

Gewinnung mononukleärer Zellen (MNZ)

Aus den frisch getöteten gesunden oder arthritischen C57BL/6-Mäusen wurden Lymphknoten und Milzen unter aseptischen Bedingungen entnommen und in komplettes RPMI überführt. Die Zellen wurden durch Zerzupfen der Organe mit einer sterilen Pinzette suspendiert und über ein Zellsieb gegeben. Organreste wurden vorsichtig mit einem Spritzenstempel auf dem Zellsieb zerrieben.

Nach Waschen der Zellsuspension in RPMI wurde zur Entfernung von Erythrozyten und /oder toten Zellen ein Lymphozytenseparationsmedium (Gibco) mit der Suspension überschichtet und bei einer Beschleunigung von 600 g für 18 min zentrifugiert. Die in der Interphase enthaltenen mononukleären Zellen wurden abpipettiert und mit RPMI gewaschen. Zur Abreicherung adhärenter Zellen wurde die Zellsuspension für ca. 30 min auf einer unbehandelten Petrischale (ca. 10⁸ Zellen / Ø 100 mm) inkubiert. Nicht adhärenente Zellen wurden abgenommen und mit Trypanblau auf Vitalität überprüft. Diese mononukleären Zellen (MNZ) wurden entweder für eine Kokultur oder für die Separation in CD4⁺ und CD4⁻ T-Zellen verwendet.

Ein Teil der MNZ (5×10⁶) wurden für die Zytokinmessung im FACS mit PMA / Ionomycin und Monensin stimuliert (siehe Kap. 2.2.5 Charakterisierung der T-Zellen).

Separation von CD4⁺ und CD4⁻ T-Zellen - Positiv-Selektion

Aus den oben gewonnenen MNZ wurden mittels MACS-System über das Oberflächenmolekül CD4 Th-Zellen isoliert. Da CD4 in Mäusen auf Th-Zellen, aber nicht auf Makrophagen exprimiert wird (Crocker et al., 1987), werden mit dieser Methode über 95% Th-Zellen angereichert. Die MNZ wurden hierfür in einer Konzentration von 1×10⁸/ml in kaltem MACS-Puffer suspendiert und mit

0,5 µg anti-CD4-FITC/ 4×10^6 Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Entfernen des überschüssigen Antikörpers durch zweimaliges Waschen mit MACS-Puffer, wurden 10^8 Zellen in 950 µl Puffer aufgenommen, 50 µl anti-FITC-Magnetobeads zugegeben und 15 min bei 4-8 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf eine mit 3 ml MACS-Puffer gewaschene LS⁺ Säule in einer MidiMACS-Separationseinheit pipettiert. Die mit Magnetobeads markierten Zellen wurden durch den Magneten in der Säule zurückgehalten, während nicht-markierte Zellen (CD4⁻) im Durchfluß zu finden waren. Die Säule wurde dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen und anschließend wurden die CD4⁺ T-Zellen mit 5 ml MACS-Puffer nach Entfernen des Magneten durch leichten Druck von oben mittels eines Spritzenstempels eluiert.

Ein Aliquot der ungetrennten MNZ sowie je ein Aliquot der CD4⁺ und CD4⁻ Fraktion wurden für die FACS-Analyse zur Überprüfung der Reinheit zurückbehalten.

Die CD4⁺ T-Zellen wurden entweder direkt nach der Separation für die Kokultur eingesetzt oder für 5 h mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert, gewaschen und dann für weitere 3-4 Tage bis zum Ansatz der Kokultur in RPMI kultiviert.

Separation von CD4⁺ T-Zellen - Negativ-Selektion

Für die Generierung von Th1- und Th2-Zellen *in vitro* wurden CD4⁺ Zellen aus MNZ von Normalmäusen (gepoolte Milz- und Lymphknotenzellen) über eine Negativ-Selektion gewonnen.

Tab. 2 Antikörper für die Negativ-Selektion

Verwendete Antikörper	Klon	eingesetzte Menge
rat anti-mouse Fc II/III	24G2	10 µg/ 1×10^7 Zellen
rat anti-mouse Mac-1	M1/70	10 µg/ 1×10^7 Zellen
rat anti-mouse CD8	2.4.3	10 µg/ 1×10^7 Zellen
rat anti-mouse MHC II	NIMR-4	1 µg/ 1×10^7 Zellen
anti-B220	RA3-6B2	5 µg/ 1×10^7 Zellen

Die Antikörper gegen Fc II/III, Mac-1 und CD8 sind aus Hybridomkulturüberständen selbst hergestellt und aufgereinigt worden, anti- MHC II ist von Southern Biotechnology, anti-B220 von BD.

Die MNZ aus nicht immunisierten jungen Mäusen wurden in MACS-Puffer zu 1×10^8 Zellen/ml resuspendiert und mit den in der Tabelle 2 aufgelisteten Antikörpern für 20 min bei 4 °C inkubiert, anschließend zweimal mit MACS-Puffer gewaschen und mit anti-rat IgG- und anti-mouse IgG-gekoppelten Dynabeads in einer Konzentration von ca. 3 Beads pro Target-Zelle für 20 min bei 4 °C unter häufigem Schwenken inkubiert. Dann wurden die positiv markierten Zellen durch den Dynal-Magneten aus der Zellsuspension entfernt. Die verbleibende CD4⁺ Fraktion wurde für die Isolierung der naiven T-Zellen weiter verwendet.

Separation von naiven Th-Zellen

Aus der CD4⁺ Fraktion der Negativ-Selektion wurden die naiven T-Zellen über ihre Expression von L-Selektin mit dem MACS-System isoliert. Dazu wurden die Zellen zu 1×10⁸/ml in MACS-Puffer suspendiert und mit 10 µl anti-L-Selektin-MACS-Beads/10⁷ Zellen für 15 min bei 4 °C inkubiert.

Die Suspension wurde über eine LS⁺ Säule in L-Selektin⁺ und L-Selektin⁻ CD4⁺ Zellen am MACS-Magneten getrennt. Die positive Fraktion wurde in 2 Parts aufgeteilt und je ein Teil für die Th1- und Th2-Generierung eingesetzt.

In-vitro-Generierung von Th1- und Th2-Zellen

Die L-Selektin⁺ CD4⁺ Zellen wurden auf einer 24-Well Gewebekulturplatte mit anti-CD3 (0,5 µg/Well) und anti-CD28 (1 µg/Well) für 48 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und für 5 Tage weiter in RPMI kultiviert. Das verbrauchte Medium wurde alle 1-2 Tage durch frisches ersetzt. Für die Differenzierung in Th1- und Th2-Zellen wurde während der gesamten Dauer der Kultivierung ein Cocktail aus Zytokinen und Antikörpern zugesetzt (Tab.3).

Tab. 3: Zytokin/Antikörper-Cocktail für die Generierung von Th-Subpopulationen

Zytokine/Antikörper	Th1-Generierung	Th2-Generierung
IL-2 (Proleukin, Chiron)	50 U/ml	25 U/ml
rmIFN-γ (Life Technol)	250 U/ml	-
IL-12 (R&D)	1000 U/ml	-
anti-IL-4 (BD)	1 µg/ml	-
rmIL-4 (PreproTec)	-	20 ng/ml
anti-IFN-γ (BD)	-	5 µg/ml
anti-IL-12 (BD)	-	10 µg/ml

Ex-vivo-Separation von IFN-γ⁺ und IFN-γ⁻ Zellen

Zur Isolierung von Th-Subpopulationen aus immunisierten Tiere wurden aus den gepoolten Milzen und Lymphknoten MNZ separiert. Aus den MNZ wurden die Th-Zellen anhand der CD4⁺ Expression mit Dynal-Magnetobeads isoliert. Anschließend sind diese anhand des membrangebundenen IFN-γ weiter in die IFN-γ⁺ und IFN-γ⁻ Zellsubpopulationen mit Magnetobeads aufgetrennt worden.

Nach der MNZ-Isolierung wurden die CD4⁺ Th-Zellen durch Markierung mit anti-mouse CD4 Dynabeads isoliert. Die Menge der einzusetzenden Beads hängt hierbei vom Anteil der CD4⁺ Zellen ab. Es sollten 3 Beads pro Zielzelle, d.h. pro CD4⁺ Zelle, eingesetzt werden. Für die Berechnung der Bead-Menge wurde davon ausgegangen, daß sich in der MNZ-Suspension etwa 15-25 % CD4⁺ Th-Zellen als Zielzellen befinden. Für die Isolierung wurden die MNZ in einer Konzentration von 5×10⁷/ml in eiskaltem MACS-Puffer suspendiert und mit der entsprechenden Menge von anti-CD4

Dynabeads für 20 min bei 4 °C unter häufigem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden nicht-gebundene Zellen von den gebundenen mit dem Magnetic Particle Concentrator (MPC) getrennt. Die Beads mit den gekoppelten Zellen wurden noch zweimal vorsichtig mit MACS-Puffer gewaschen und dann in RPMI resuspendiert. Zur Entfernung der CD4 Dynabeads von den Th-Zellen erfolgte die Zugabe von DETACHaBEAD Mouse CD4 (im Verhältnis 1:2 zu den Dynabeads). Während der Inkubationszeit von 45 min bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension häufig geschwenkt, um ein Sedimentieren der T-Zellen zu verhindern. Im Anschluß an die Inkubation liegen die Zellen von den Beads abgespalten frei in Lösung vor und können nach Bindung der Dynabeads im MPC abgenommen werden. Da geringe Mengen Dynabeads die weitere Aufarbeitung stören würden, wurden eventuell vorliegende restliche Beads nochmals mit dem Magneten aus der CD4⁺ Th-Zellsuspension entfernt.

Für die Separation anhand des IFN- γ wurden die CD4⁺ Th-Zellen zu 2×10^6 Zellen/ml in komplettem RPMI suspendiert und für 5 h mit 20 ng/ml PMA und 1000 ng/ml Ionomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ stimuliert, um die Expression von IFN- γ auf der Zelloberfläche von Th1-Zellen zu induzieren. Danach wurden die Zellen mit eiskaltem MACS-Puffer gewaschen und zu 2×10^8 /ml in MACS-Puffer suspendiert. Um Fc-Rezeptoren zu blocken, wurden zunächst 10 μ g/ml anti-FcR II/III (Klon: 24G2) zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der überschüssige Antikörper durch Waschen der Zellen entfernt, die Zellen wieder zu 2×10^8 /ml in MACS-Puffer suspendiert und dann mit 10 μ g/ml Digoxigenin (Dig)-markiertem anti-IFN- γ Antikörper (Prof. Radbruch, DRFZ Berlin) für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen, zu 2×10^8 /ml suspendiert und mit 200 μ l/ml anti-Dig-Multisort-Magnetobeads für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Die an IFN- γ -exprimierende Zellen gebundenen Beads wurden über eine Säule magnetisch getrennt. Dazu wurden die Zellen über eine vorgekühlte und gewaschene LS⁺ Säule, angebracht in der MidiMACS-Separationseinheit, aufgetragen. Zur Verminderung der Flußgeschwindigkeit war am Ausfluß der Säule eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,4 mm angebracht. Der erste Durchfluß mit den nicht-magnetisch markierten Zellen, d.h. die IFN- γ ⁻ Population, wurden in einem PS-Röhrchen aufgefangen. Davon wurde ein Aliquot für die Charakterisierung der T-Zellen für weitere 1,5 h mit 5 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin und 10 μ g/ml Brefeldin stimuliert und wie unter 2.2.5 fixiert und gefärbt. Die restlichen Zellen wurden für 4 weitere Tage in komplettem RPMI bis zum Ansatz der Kokultur kultiviert. Die auf der Säule gebundenen IFN- γ ⁺ Zellen wurden durch dreimaliges Spülen der Säule mit je 3 ml eiskaltem MACS-Puffer in der Separationseinheit gewaschen. Dann wurden die positiven Zellen durch Entfernen des Magneten und durch leichten Druck mit einem Spritzenstempel mit 5 ml MACS-Puffer eluiert. Von diesen IFN- γ ⁺ T-Zellen wurde ebenfalls ein Aliquot für die Charakterisierung der T-Zellen entnommen (s.o.) und der Rest auch in komplettem RPMI 4 Tage bis zum Einsatz für die Kokultur bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das verbrauchte Medium wurde nach 2-3 Tagen durch frisches ersetzt.

2.2.5 Charakterisierung der T-Zellen

Die T-Zellen oder mononukleären Zellen wurden zu 1×10^6 /ml in 6-Well Kulturplatten ausgesät und mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin in Gegenwart von 2 μ M Monensin für 5 h bei 37 °C, 5% CO₂ stimuliert. Nach Stimulierung wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in 3 % Formaldehyd in PBS für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden noch dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und direkt für die Färbung verwendet oder für bis zu 3 Tagen bei 4 °C aufbewahrt.

Tab. 4: Antikörper für die FACS-Analyse

Antikörper	Klon	Isotyp	Markierung	μ g/ 10^6 Zellen
Anti-CD4	GK1.5	Rat IgG1	FITC	0,25
Anti-IFN- γ	XMG1.2	Rat IgG1	FITC oder PE	0,25
Anti-IL-2	JES6-5H4	Rat IgG2b	PE	0,25
Anti-IL-4	BVDA-1D11	Rat IgG2b	PE	0,25
Anti-IL-10	JES5-16E3	Rat IgG2b	PE	0,12
Anti-IL-17	TC11-18H10.1	Rat IgG1	PE	0,25
Anti-TNF- α	MP6-XT22	Rat IgG1	PE	0,06
IgG1	R3-34	Rat IgG1	FITC oder PE	0,25
IgG2b	R35-38	Rat IgG2b	PE	0,25

Die Antikörper wurden alle von Becton Dickinson (BD), Heidelberg bezogen

Für die spezifische Zytokinfärbung wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml Saponinpuffer 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, abzentrifugiert und in 50 μ l Saponinpuffer resuspendiert. Dann wurde der entsprechende fluoreszenzmarkierte Antikörper (s. Tab. 4) zugegeben und bei 4 °C im Dunkeln für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Saponinpuffer und einmal mit FACS-Puffer gewaschen, in 500 μ l aufgenommen und im Durchflußzytometer nach Kalibrierung und Kompensation der Fluoreszenzkanäle gemessen. Die Auswertung erfolgte mit WinMDI Software. Für die Berechnung des Anteils der markierten Zellen wurden die Marker im Histogramm auf 1 % des Signals der Isotypkontrollen gesetzt (Hintergrundsignal).

2.2.6 Kokultur von Synoviozyten mit MNZ oder T-Zellen bzw. T-Zell-Subpopulationen

Zwei Tage vor Kokultur wurden die Synoviozyten in 96-Well Gewebekulturplatten zu 2×10^4 Zellen/Well oder in 24-Well Gewebekulturplatten zu 1×10^5 Zellen/Well ausgesät und in komplettem DMEM mit 10 % FCS kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen, um restliches FCS zu entfernen und dann mit MNZ bzw. T-Zellen in FCS-freiem komplettem DMEM für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kokultiviert. Für die Kokultur in 96-Well Gewebekulturplatten wurden 2×10^5 MNZ oder T-Zellen/Well und in 24-Well Gewebekulturplatten

1×10^6 MNZ oder T-Zellen/Well eingesät. Als Kontrollen wurden parallel Synoviozyten ohne T-Zellen oder MNZ sowie T-Zellen oder MNZ allein auch in FCS-freiem DMEM kultiviert.

In einigen Kokulturanätzen wurde der direkte Zellkontakt zwischen Synoviozyten und T-Zellen durch Einsatz von Transwellmembraneinsätzen ($\varnothing 0,1 \mu\text{m}$) unterbunden, wobei ein Medienaustausch weiter möglich war.

Zur Modulation der Interaktionen oder zur Stimulierung der Synoviozyten wurden der Kultur während der 48-stündigen Kultivierung Zytokine, TGF- $\beta 1$ (Tab. 5) und / oder LPS in verschiedenen Konzentrationen (siehe Ergebnisse) zugesetzt.

Nach 48-stündiger Kultivierung wurde das Kulturmedium abgenommen, die darin befindlichen Zellen abzentrifugiert und der Überstand in Aliquots für spätere Analysen bei -70°C eingefroren. Erfolgt die Kultivierungen in 96-Well-Platten, wurde der Zellrasen weiter für einen Zell-ELISA verwendet.

Tab. 5: Eingesetzte Zytokine und Wachstumsfaktoren in der Kultur/Kokultur

Zytokin	gewonnen aus	Quelle	spezifische Aktivität
rhIL-1 β	E.coli	R&D	1×10^8 U/mg
rmTNF- α	E.coli	Live Technologies	1×10^7 U/mg
rmIFN- γ	CHO	Live Technologies	1×10^7 U/mg
rmIL-2	E.coli	PreproTec	5×10^6 U/mg
rmIL-4	E.coli	PreproTec	1×10^7 U/mg
rmIL-10	E.coli	R&D	2×10^6 U/mg
rmIL-17	E.coli	R&D	5×10^5 U/mg
rhTFG- $\beta 1$	CHO	R&D	$2,5 \times 10^7$ U/mg

2.2.7 Analyse der Kulturüberstände

2.2.7.1 NO-Bestimmung

Benötigte Reagenzien: Griess-Reagenz

Standard: 1 mM NaNO₂ (Fluka), 1:2 Verdünnungsreihe

Das von Zellen gebildete NO ist in der Kulturlösung nicht lange haltbar und reagiert zu HNO₂, welches zu H⁺ und NO₂⁻ dissoziiert. Das entstandene Nitrit wird mit Griess-Reagenz bestimmt.

Dazu werden 100 μl Probe oder Standard pro Well in eine 96-Well Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 100 μl Griess-Reagenz im Dunkeln für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte sofort die Messung der Optischen Dichte (O.D.) im Photometer für Mikrotiterplatten (SLT) bei 570 nm gegen einen Referenzfilter von 620 nm. Die Berechnung der NO-Konzentration erfolgte durch die Quantifizierung über die Verdünnungsreihe des Standards.

2.2.7.2 Bestimmung von Zytokinen und PGE₂

ELISA

Tab. 6: Antikörper für ELISA-Bestimmungen

Antikörper	Klon	Konzentration	Beladungspuffer	Quelle
IFN- γ	R4-6A2	2 μ g/ml	Na-PP pH 9,0	Becton Dickinson
IFN- γ Biotin	XMG1.2	1 μ g/ml	-	Becton Dickinson
IL-2	JES6-1A12	1 μ g/ml	Na-PP pH 9,0	Becton Dickinson
IL-2 Biotin	JES6-5H4	0,5 μ g/ml	-	Becton Dickinson
IL-4	BVD4-1D11	2 μ g/ml	Na-PP pH 9,0	Becton Dickinson
IL-4 Biotin	BVD6-24G2	1 μ g/ml	-	Becton Dickinson
IL-5	TRFK5	2 μ g/ml	Na-CO pH 9,5	Becton Dickinson
IL-5 Biotin	TRFK5	0,25 ng/ml	-	Becton Dickinson
IL-6	MP5-20F3	2 μ g/ml	Na-CO pH 9,5	Becton Dickinson
IL-6 Biotin	MP5-32C11	0,25 ng/ml	-	Becton Dickinson
IL-17	50101 111	2 μ g/ml	PBS	R&D
IL-17 Biotin	polyclonal goat	100 ng/ml	-	R&D
TNF- α	G281-2626	6 μ g/ml	Na-PP pH 6,5	Becton Dickinson
TNF- α Biotin	MP6-XT3	0,5 μ g/ml	-	Becton Dickinson
IL-1 β	MAB401	2 μ g/ml	Na-CO pH 9,5	R&D
IL-1 β Biotin	BAF401	50 ng/ml	-	R&D
IL-10	(nicht angegeben)	-	Na-PP pH 6,5	OptEIA™ Sets, BD
IL-10 Biotin	(nicht angegeben)	-	-	OptEIA™ Sets, BD

Tab. 7: Standards für die ELISA-Bestimmungen

Zytokin	Quelle
rmIFN- γ	Gibco
rmIL-2	Becton Dickinson
rmIL-4	Tebu
rmIL-5	Becton Dickinson
rmIL-6	Becton Dickinson
rmIL-17	R&D
rmTNF- α	Becton Dickinson
rmIL-1 β	Becton Dickinson
rmIL-10	Becton Dickinson (Kit)

Die im Zellkulturüberstand befindlichen Zytokine wurden mit dem Sandwich-ELISA bestimmt. Dazu wurden 96-Well Platten mit 50 µl/Well eines Capture-Antikörper (s. Tab.6) in Beladungspuffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am folgenden Tag wurden die Platten dreimal mit dem Waschgerät Columbus (SLT) gewaschen und anschließend unspezifische Bindungsstellen mit Blockierungspuffer für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Dem anschließenden dreimaligen Waschen folgte die Auftragung der Proben einer Standardreihe und eines Leerwertes (Medium der Kulturen). Nach 3 h Inkubation bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C wurden die Platten fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurden je 100 µl/Well biotinylierter Detektionsantikörper in Assay-Puffer (Konzentration s. Tab.6) aufgetragen und für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem fünfmaligen Waschen wurden die Platten mit 100 µl/Well Streptavidin-PO (1:4000) gefüllt, 40 min inkubiert, wieder fünfmal gewaschen und anschließend 100 µl Substratlösung aufgetragen. Der Farbumsatz erfolgte im Dunkeln und nach Entwicklung der Standardfarbreihe wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl/Well 2N H₂SO₄ gestoppt. Die Extinktion wurde im ELISA-Reader bei 492 nm gegen einen Referenzfilter von 620 nm gemessen. Die Daten wurden nach Konvertierung in ein MS-Excel-Format anhand der Standardkurve in Konzentrationen umgerechnet.

Für die Bestimmung des Prostaglandin E₂ wurde der ELISA-Kit von R&D verwendet und nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Bioassay für IL-6

Zum Nachweis von biologisch aktivem IL-6 in Zellkulturüberständen wurde die IL-6-sensitive B9-Maus-Zelllinie eingesetzt. Die Proliferation der Zellen ist proportional zum IL-6-Gehalt im Medium und ermöglicht daher die Bestimmung der IL-6-Konzentration in Proben. Die Konzentration wurde aus dem Titer einer 1:2 Verdünnungsreihe bei halbmaximaler Proliferationsrate bestimmt. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe aus rekombinantem IL-6 (Boehringer) hergestellt, als Negativkontrolle diente Medium ohne IL-6-Zusatz.

Für den Test wurden zunächst B9-Zellen in Kulturplatten in IL-6-haltigem Medium (Makrophagenüberstand) gezüchtet und 1 Tag vor Verwendung für den Test in einer Konzentration von 1×10⁵ Zellen/ml in Medium mit geringer IL-6-Konzentration (5 % Zellkulturüberstand in IL-6-freiem Medium) ausgesät, um einen „Hungerzustand“ in den Zellen zu erreichen.

Am Tag des Testansatzes wurden in 96-Well Flachboden-Kulturplatten in jedes Well 50 µl B9-Medium vorgelegt. In das obere Ausgangswell wurden 50 µl Probe oder Standard pipettiert und eine 1:2 Ausverdünnung über 14 Wells vorgenommen, so daß 50 µl Medium mit Probe, Standard oder Leerwert vorlagen. Dazu wurden je 2×10⁴ B9-Zellen/Well in 50 µl zugegeben und die Platten für 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂, 95 % relativer Luftfeuchte inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl MTT (3-(4,5)-Dimethyldiazol-2-yl)-2,3-diphenyltetrazoliumbromid, 5 mg/ml in PBS) pro Well. Mitochondriale Dehydrogenasen spalten dann den Tetrazoliumring des MTT und führen zur Bildung von unlöslichem Formazan in den Zellen. Nach 4 h wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl 10 %

SDS in 50 % DMFA über 3 h lysiert. Die Extinktion wurde bei 570 nm gegen einen Referenzfilter von 620 nm im ELISA-Reader gemessen. Die optische Dichte ist proportional der Zellaktivität der B9-Zellen und hängt von der IL-6-Konzentration ab. Im linearen Bereich der Standardkurve (zwischen 10 % und 90 % maximaler Aktivität) wird durch Interpolation die Verdünnung bzw. IL-6-Konzentration bei 50 % Aktivität der Zellen berechnet.

2.2.7.3 Bestimmung der MMP und TIMP

Zymographie

Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris-HCl; pH 8,3; 0,1 % SDS; 192 mM Glycin
Probenpuffer:	1,5 M Tris-HCl; pH 6,8; 10 % Glycerol; 2 % SDS; 5 % Bromphenolblau
Inkubationspuffer:	100 mM Tris-HCl; pH 7,8; 30 mM CaCl ₂ ; 0,02 % Natriumazid
Coomassie-Blau-Lösung:	10 % Essigsäure; 50 % Methanol; 0,25 % Coomassie Blue G250 (Serva)
Entfärber:	25 % Methanol; 7 % Essigsäure

Die Zymographie ist eine modifizierte SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli, bei der ein Proteasesubstrat in das Gel einpolymerisiert wird. Gelatinasen wurden über die Zymographie mit Gelatine-Gelen und caseinolytisch aktive Proteasen mit Casein-Gelen nachgewiesen und semiquantitativ bestimmt. Für die Gelatine-Zymogramme wurden 0,8 mg/ml Gelatine (Merck) in ein 7,5 % Polyacrylamidgel eingebettet, für die Casein-Zymogramme 0,5 mg/ml Casein (Sigma) in ein 10 % Gel. Da Casein auch niedermolekulare Bestandteile enthält, die bei der Elektrophorese mitwandern, wurde für die Casein-Gele ein „Prerun“ durchgeführt, bei dem das Gel ohne Proben für 2 h und 40 mA einer Elektrophorese unterzogen wurde. Die Proben wurden mit nicht-reduzierendem Probenpuffer verdünnt und direkt auf das Gel aufgetragen. Auf die Gelatine-Zymogramme wurden humane MMP-9 und MMP-2 als Standard mitgeführt. Auf den Casein-Gelen wurde ein Molekulargewichtsmarker (wide range, Sigma) für die spätere Zuordnung zum Molekulargewicht aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 mA/Gel (10×8 mm²).

Nach Auftrennung der Proben nach Molekulargröße wurden die Gele für 2×20 min mit 2,5 % TritonX-100 (Ferak, Berlin) gewaschen, um das SDS, welches die Enzymaktivität hemmen würde, zu entfernen. Die Gele wurden bei 37 °C in Inkubationspuffer über Nacht inkubiert. Nach Inkubation wurden die Gele mit Coomassie-Blau Lösung für 45 min gefärbt und anschließend mit Entfärber solange entfärbt, bis die enzymatisch aktiven Bereiche als klare Banden sichtbar wurden. Da das SDS, welches sich zur Zeit der Elektrophorese im Gel befindet, zur Umfaltung der MMP führt, werden auch die MMP-Proformen autokatalytisch aktiviert und sind dann als Banden mit einem leicht höheren Molekulargewicht als die primär aktiv vorliegenden MMP im Gel sichtbar.

Zur Überprüfung, ob es sich bei den sichtbaren Banden um Metalloproteasen handelt, wurden parallel Gele nach der Elektrophorese bis zur Färbung immer mit 10 mM EDTA behandelt. Dadurch wird den MMP Kalzium entzogen und diese damit inaktiviert. Der Nachweis von Serin-Proteasen erfolgte

durch Zugabe des Inhibitors PMSF (Phenylmethyl-sulonylfluorid, 2 mM; Merck) in den Parallel-Ansätzen.

Zum Nachweis von TIMP, den natürlichen Gewebsinhibitoren von MMP, wurde eine reverse Zymographie durchgeführt. Dazu wurde in ein 15%iges Polyacrylamidgel mit 1,5 mg/ml Gelatine zusätzlich murine MMP-9 (Sigma) in einer Konzentration von 150 ng/ml einpolymerisiert. Die Kulturüberstände wurden mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge 4-fach aufkonzentriert, dann mit einem Fünftel des Probevolumens mit Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die weiteren Schritte erfolgten wie bei der normalen Zymographie. Nach der Färbung werden die TIMP als dunkelblau-gefärbte Banden vor einem hellblauen Hintergrund sichtbar, der durch unvollständigen Abbau der Gelatine durch MMP-9 entsteht.

Fluoreszenz-Assay

Reaktionspuffer:

100 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl + 30 mM CaCl₂ + 0,05 % Brij + 0,01 % Natriumazid; pH 7,6

APMA-Stammlösung:

20 mM in 100 mM Tris-HCl; pH 8,8 mit 5 % DMSO

EDTA-Puffer:

100 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl + 20 mM EDTA + 0,05 % Brij + 0,01 % Natriumazid; pH 7,6

Fluoreszenz-Substrate:

Peptid1: Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(Dnp)-Ala-Arg-NH₂ (Bachem)

Peptid2: Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH₂ (Bachem)

Standard:

Mca-Pro-Leu-OH (Bachem)

Um die Gesamt-Aktivitäten in den Kulturüberständen annähernd zu bestimmen, wurde der Fluoreszenzassay mit künstlichen Substraten eingesetzt. Mit diesem Test werden nur freie und aktive MMP erfaßt, jedoch nicht durch TIMP inhibierte. Als Substrate wurden gequenschte Peptide eingesetzt, die nach Anregung bei Spaltung durch MMP Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Eine Kinetik der Fluoreszenzzunahme wurde mit dem Fluoreszenzreader FluoStar Galaxy (BMG) nach Anregung bei $e_{ex} = 330$ nm bei $e_{em} = 390$ nm gemessen. Mit Hilfe des Standards wurde daraus der Substratumsatz pro Minute errechnet. Demnach wurde 1 U/ml definiert als der Substratumsatz von 1 pmol/(ml×min).

Es wurden zwei verschiedene Peptide als Substrat verwendet. Diese werden von verschiedenen MMP unterschiedlich gut gespalten. Peptid 1 wird von den meisten MMP gut gespalten, während Peptid 2 ein spezifisches Substrat für MMP-3 und in geringerem Maße auch für MMP-9 darstellt, jedoch nicht für andere MMP. Die katalytischen Umsatzgeschwindigkeiten der beiden Substrate von verschiedenen MMP sind aus Tab.8 zu entnehmen.

Für den Test wurde folgender Ansatz in schwarzen 96-Well Microtiterplatten pipettiert: 70 µl Reaktionspuffer, 10 µl Probe, Start des Assays durch Injektion von 20 µl 25 µM Peptidlösung im Fluoreszenzreader.

Vor Beginn der Substratinjektion und während der Messung wird die Platte auf 37 °C temperiert. Da auf diese Weise jedoch nur frei vorliegende MMP-Formen, die nicht durch TIMP gehemmt sind, nachgewiesen werden, waren häufig Umsätze kaum meßbar. Der Nachweis der gesamten freien MMP-Formen einschließlich der Proformen erfolgte nach Aktivierung der Proformen durch 15-minütige Inkubation mit 2 mM APMA im Reaktionspuffer bei 37 °C. Längere Aktivierungszeiten bis zu einer Stunde führten zu keiner weiteren Aktivitätszunahme. Zur Kontrolle wurden Proben in EDTA-Puffer mitgeführt. Diese zeigten aufgrund der Hemmung der MMP-Aktivität keinen Substratabbau.

Tab.8: K_{cat}/K_M Werte ($s^{-1}M^{-1}$) der Peptide als Substrat gegenüber verschiedenen MMP

	MMP-2	MMP-9	MMP-3	MMP-1	MMP-13	MMP-7
Peptid1	5 160 000* 629 000 ^a	4 420 000*	23 000	14 800	757 000 ^a	169 000
Peptid2	ND	10 100	218 000	ND	unbekannt	unbekannt

Bestimmungen bei 37 °C; pH7,5 außer a: Bestimmung bei 25 °C

ND: nicht detektierbar

(Daten aus: Fields, 2000 oder * Fasciglione, 2000)

2.2.8 Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Zell-ELISA

Fixierlösung:	1 % Glutaraldehyd in PBS
Blockierungspuffer:	2 % BSA in PBS; 0,01 % Natriumazid
Waschpuffer:	0,1 % BSA in PBS
Substrat:	OPD-Substrat-Lösung für Peroxidase Nachweis (frisch hergestellt, s.S.18)
Kristallviolett:	0,25 % Kristallviolett in 20 % Methanol
Isopropanol/HCl:	40 mM HCl in Isopropanol

Der Zellrasen der Synoviozyten in den 96-Well Platten wurde nach dem Versuchsansatz mit 37 °C warmem PBS vorsichtig gewaschen und dann mit 100 µl Fixierlösung/Well für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde der Zellrasen wieder mit PBS gewaschen und dann über Nacht bei 4 °C mit 200 µl Blockierungspuffer/Well geblockt.

Die Detektion erfolgte mit 100 µl anti-VCAM-1-Biotin (Pharmingen) (0,5 µg/ml in 0,1 % BSA PBS) für 1,5 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen wurde der sekundäre Antikörper Streptavidin-PO (1:4000, Dianova) aufgetragen. Nach 45 min wurden die Platten fünfmal gewaschen und anschließend in jedes Well 100 µl Substratlösung pipettiert. Nach 7 min Entwicklung wurde die Absorption bei 450 nm gegen einen Referenzfilter mit 620 nm gemessen.

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden die Platten nach Entfernung des Substrates mit 50 µl Kristallviolett gefärbt, anschließend fünfmal mit klarem warmen Wasser ausgewaschen. Die Kristalle wurden dann in 40 µl Isopropanol/HCl innerhalb von 15 min unter ständigem Schwenken der Platte gelöst und die O.D. bei 570 nm gegen einen Referenzfilter von 620 nm gemessen. Eine Verdünnungsreihe von Zellen mit definierter Zellzahl diente zur Erstellung einer Standardkurve. Die gemessenen O.D.-Werte wurden anhand dieser Standardkurve in Zellzahlen umgerechnet.

2.2.9 Apoptose-Test

Für den Versuchsansatz wurden Synoviozyten aus arthritischen Gelenken (7d AIA) nach der 3. Passage und MNZ aus Milzen und Lymphknoten arthritischer Mäuse verwendet. Die gepoolten Milz- und Lymphknotenzellen wurden nach Trennung auf Lymphozytenseparationsmedium (LSM) durch Kultivierung auf unbeschichteten Platten von adhären Zellen abgereichert (siehe Kap. 2.2.4 Gewinnung MNZ). Diese Zellen wurden 5 Tage vor dem Kokulturanatz für 2 Tage mit anti-CD3-(1452C 11, aufgereinigter Hybridomüberstand aus eigenem Labor) und anti-CD28-(Pharmingen) Antikörper stimuliert. Direkt vor dem Kokulturanatz wurden eventuell vorhandene tote Zellen durch Zentrifugation auf LSM entfernt. Die Synoviozyten wurden 1 Tag vor dem Kokulturanatz in serumhaltigem DMEM (10 % FCS) zu 5×10^5 /Well in 6-Well Gewebekulturschalen (Biocoat Variety Pack I, BD) ausgesät, die mit Kollagen Typ I (Rattenschwanz), Fibronectin (aus humanem Blutplasma), Laminin (aus einem Maus-Tumor), Poly-D-Lysin (synthetisch) oder unbeschichtet waren. Nach 24 h, als ein fast konfluenter Zellrasen gewachsen war, wurde der Rasen gewaschen und in frischem FCS-freiem DMEM weiterkultiviert oder mit 2×10^6 MNZ/Well in FCS-freiem DMEM kokultiviert. Nach 48-stündiger Kultur bzw. Kokultur auf den verschieden beschichteten Platten wurden die Zellen im Überstand abpipettiert und die Zellen des Zellrasens durch Trypsinieren geerntet. Die Zellen aus dem Überstand und des Zellrasens wurden vereinigt, gewaschen und nach Vorschrift für die Analyse im Durchflußzytometer fixiert, markiert, gemessen und analysiert.

Der Test auf Apoptose in den Zellen wurde mit dem APO-DIRECT-Kit von Pharmingen nach Instruktion des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode werden DNA-Brüche nachgewiesen. Hierbei katalysiert das Enzym Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) die Kopplung von FITC-markiertem dUTP an die 3'-Enden der DNA-Bruchstücke; die gesamte DNA wird mit Propidiumiodid gefärbt.

2.2.10. Präparation für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM)

In eine 24-Well-Kulturplatte wurden sterile Glasplättchen mit einem Durchmesser von 1,2 cm eingelegt. Nach der 3. Passage wurden 1×10^5 SZ/Well transferiert und bis zu einem fast konfluenten Rasen kultiviert. Th-Zellen, aus Milzen und Lymphknoten gepoolt und für 4 h mit PMA und Ionomycin stimuliert, wurden in DMEM mit 10 % FCS zu 1×10^6 /ml suspendiert. Davon wurden jeweils 1 ml/Well auf den mit PBS gewaschenen Rasen der SZ aufgetragen und für 48 h bei 5 % CO₂ und 37 °C kokultiviert. Anschließend wurde der Zellrasen vorsichtig mit PBS gespült und mit 2 %

Glutaraldehyd-Lösung in 0,1 M Cacodylatpuffer 30 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit Cacodylatpuffer wurde der Zellrasen in einer Alkoholreihe entwässert und für die REM Aufnahmen präpariert. Dazu wurden die Präparate in einer Kammer eines Kritischpunkttrockners (BAL-TEL CPD30, Bal-Tec AG, Balzers, Lichtenstein) mit CO₂ getrocknet und in einem „sputter coater“ (BAL-TEC SCD005, Bal-Tec AG) in Argonatmosphäre 20-40 nm dick mit Gold beschichtet. Die Objekte wurden im Rasterelektronenmikroskop (LEO 1450 VP, Leo Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen) begutachtet.

2.2.11 Kontrolle der Mykoplasmenfreiheit der Kulturansätze

Um auszuschließen, daß die Reaktionen der Zellen in der Kokultur nicht auf Mykoplasmen-Kontaminationen zurückzuführen sind, wurden von den Kulturüberständen regelmäßig Stichproben genommen und mit dem ELISA-Mykoplasmen-Kit von Roche auf *M. orale*, *M. arginini*, *M. hyorhinae*, *M. laidlawii* getestet. Für die Auswertungen wurden nur Kulturen verwendet, deren Testergebnis negativ war.

2.2.12 Statistische Auswertung

Um ausreichende Volumina für die Messungen in Kulturüberständen zu erhalten, wurden die Überstände von Parallelansätzen gepoolt, so daß hier innerhalb eines Experiments keine statistische Analyse durchgeführt werden konnte.

Einige Experimente, deren Ergebnisse sehr gut reproduzierbar waren, sind nur zweimal durchgeführt worden. In diesen Fällen wurden bei den Darstellungen der Ergebnisse jeweils ein Experiment als Beispiel in den Abbildungen dargestellt. Die wenigen Probezahlen ermöglichten hier keine statistische Analyse.

Die Meßergebnisse von Experimenten, die mehr als dreimal durchgeführt wurden, wurden mit der Software SPSS statistisch ausgewertet. Die Berechnung der signifikanten Unterschiede wurde mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Die Bewertung der Signifikanzen wurde wie folgt vorgenommen: $p > 0,05$ nicht signifikant; $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ sehr signifikant; $p \leq 0,001$ extrem signifikant. Für diese Fälle sind in den Diagrammen die Mittelwerte und die Standardabweichungen ausgehend von einer Stichprobe oder die mittleren Standardfehler (SEM) dargestellt.

In einigen Fällen schwankten die Basiswerte für einige Meßparameter von Experiment zu Experiment sehr stark. Hier wurden die Meßwerte für die Berechnung signifikanter Unterschiede in relative Einheiten umgerechnet, wobei für IL-6 und NO die unstimulierten Synoviozyten und für die Th-Zytokine IL-2, IL-4, IFN- γ und IL-10 die T-Zell-Monokultur als Vergleichsproben dienten und 100 % gesetzt wurden.

Für die Darstellung der Ergebnisse des Zell-ELISA und der Zellzahlbestimmung wurde jeweils nur ein repräsentatives Experiment ausgewählt, da hier in jedem Experiment 4-5 Parallelansätze gemessen werden konnten, deren Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt sind. Die Berechnung von Signifikanzen wurde hier innerhalb eines Experimentes vorgenommen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Wirkung von Th-Zytokinen auf Synoviozyten

Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit Synoviozyten (SZ) durch lösliche Th-Zytokine beeinflusst werden. Insbesondere der Einfluß des Th1-Zytokins IFN- γ im Vergleich zu den Th2-Zytokinen IL-4 und IL-10 auf SZ sollte verglichen werden, um deren Rolle in den späteren Kokulturen mit den entsprechenden Th-Subpopulationen einschätzen zu können.

3.1.1 Einfluß von Th-Zytokinen auf unstimulierte Synoviozyten

Synoviozyten, gewonnen aus normalen (gesunden) oder arthritischen (7d AIA) Gelenken von C57BL/6-Mäusen, wurden für 48 h mit Zytokinen, die typischerweise von Th-Zellen gebildet werden (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN- γ und TNF- α), stimuliert. In den Kulturüberständen wurden die sezernierten Mediatoren NO, IL-6, TNF- α , IL-1 β sowie MMP und TIMP bestimmt.

IFN- γ , aber auch IL-17 und TNF- α wirkten stark stimulierend auf die NO- und IL-6-Produktion von SZ (Abb.6). SZ aus normalen und arthritischen Gelenken zeigten in ihrer Stimulierbarkeit keine deutlichen Unterschiede. Um eine statistische Aussage machen zu können, wurden deshalb in Abb.6 die Ergebnisse von 4 Einzelversuchen (2 \times arthritische und 2 \times normale SZ) zusammengefaßt. Die sezernierten IL-6-Mengen von SZ aus verschiedenen Präparationen variierten allerdings relativ stark. Dies könnte entweder durch eine spontane IL-6-Sekretion erklärbar sein oder darauf hinweisen, daß die Zellen selbst nach der 3. Passage noch eine große Heterogenität aufwiesen oder aber, daß es schon zu einer starken Dedifferenzierung der Synovioyten gekommen war.

Da die Aktivität des IL-6 den Korezeptor gp130 erfordert, spiegeln die im ELISA nachgewiesenen IL-6-Mengen nicht unbedingt auch deren Aktivität wider. Deshalb wurde die IL-6-Aktivität im Kulturüberstand zusätzlich mit einem Bioassay erfaßt. Es zeigte sich hierbei eine Korrelation zu den im ELISA gemessenen Werten (Ergebnisse nicht dargestellt).

Auch IL-10 vermochte SZ zu einer erhöhten IL-6-Sekretion anzuregen. Die IL-6- und NO-Stimulierungen erfolgten konzentrationsabhängig (Abb.7). NO wurde durch IFN- γ effektiver stimuliert als durch TNF- α .

IL-1 β und TNF- α waren in den Kulturüberständen nicht nachweisbar (unter der Nachweisgrenze von 30 pg/ml).

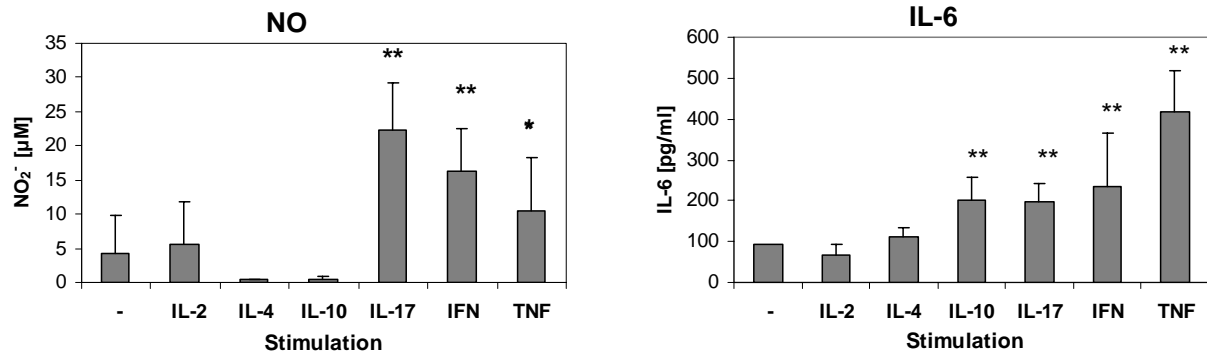


Abb. 6: NO und IL-6 in Kulturüberständen von Zytokin-stimulierten Synoviozyten

SZ (aus 7d AIA- oder gesunden Mäusen) wurden für 48 h in serumfreiem Medium mit verschiedenen Th-Zytokinen inkubiert (IL-2: 50 U/ml; IL-4: 100 U/ml; IL-10: 50 U/ml; IL-17: 200 U/ml; IFN- γ : 100 U/ml; TNF- α : 100 U/ml). In Kulturüberständen wurden anschließend die NO-Konzentration mit Griess-Reagenz (links) und IL-6 mit ELISA (rechts) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 4 Versuchen (2 mit SZ aus arthritischen und 2 mit SZ aus normalen Gelenken) und die Standardabweichungen, ausgehend von einer Stichprobe. Signifikante Unterschiede zu unstimulierten SZ (-) sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

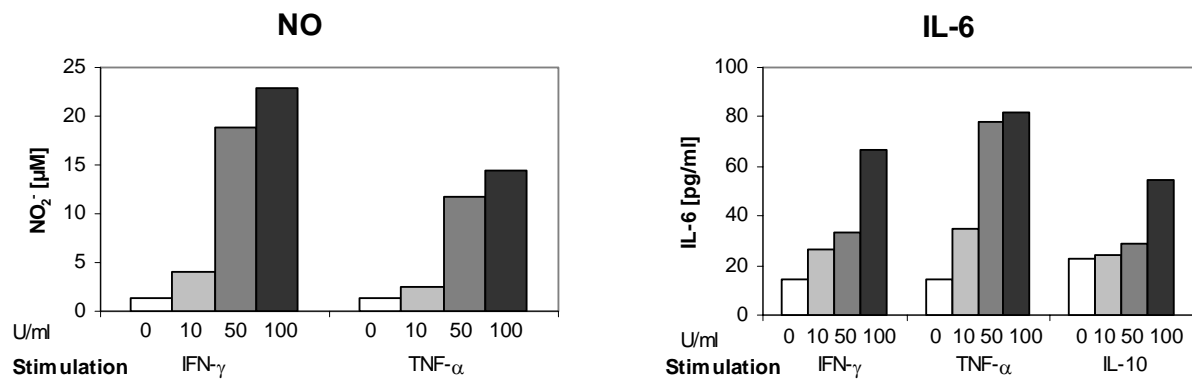


Abb. 7: Konzentrationsabhängigkeit der Stimulierung von SZ

NO und IL-6 in Kulturüberständen von SZ aus normalen Gelenken nach 48h Inkubation mit IFN- γ , TNF- α und IL-10 in verschiedenen Konzentrationen, NO-Bestimmung mit Griess-Reagenz, IL-6-Bestimmung mit ELISA. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel aus 2 Versuchen.

Die sezernierten MMP-Mengen wurden zymographisch nachgewiesen (Abb.8). In den Gelatine-Zymogrammen stellen sich die Gelatinasen pro-MMP-2 bei 66 kD und pro-MMP-9 bei 105 kD dar. Die entsprechenden aktiven Enzyme mit einem ca. 10 kD kleinerem Molekulargewicht waren nicht nachweisbar. MMP-2 wurde von den SZ konstitutiv exprimiert und durch die Zytokine nicht wesentlich verändert. MMP-9 war in unstimulierten SZ kaum nachweisbar, in den SZ aus normalen Mäusen meistens gar nicht, in unstimulierten SZ aus arthritischen Mäusen häufig nur schwach (Ergebnisse nicht dargestellt). TNF- α und IL-17 führten zu einer deutlichen Induktion bzw. Steigerung der MMP-9. IFN- γ vermochte MMP-9 nur schwach und bei hoher Konzentration zu induzieren. Im Casein-Zymogramm erschien nur nach Stimulation mit TNF- α und IL-17 eine deutliche Bande bei 57 kD (Abb.8, untere Reihe). Die Inhibierbarkeit der Aktivität dieser Bande durch

EDTA und durch Phenantrolin deuten auf eine Metalloprotease. Vermutlich handelt es sich bei diesem Enzym um MMP-3, da diese gute caseinolytische Aktivität besitzt und ein Molekulargewicht von ca. 57 kD aufweist. Es sind kaum aktivierte MMP-Formen in den Zymogrammen erkennbar. Dies deutet darauf hin, daß im Kulturüberstand keine Faktoren vorkommen, die zu einer Aktivierung der MMP führen.

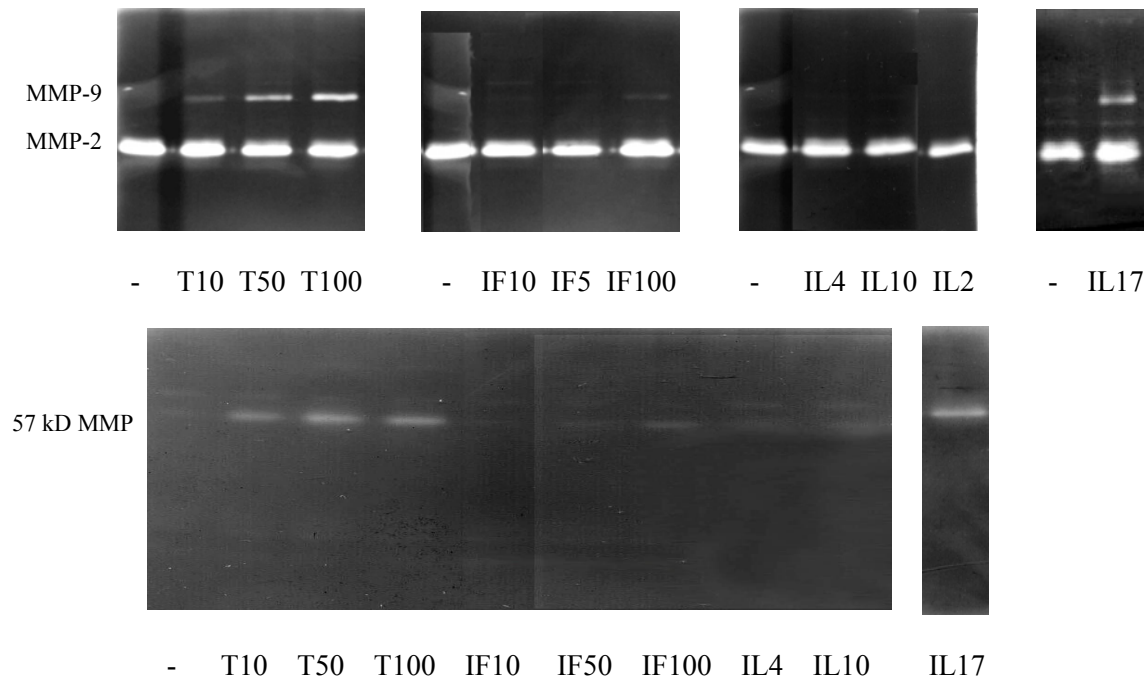


Abb. 8: Zymogramme der Kulturüberstände nach Stimulierung mit verschiedenen Zytokinen

SZ (7 d AIA, 4. Passage) wurden für 48 h in serumfreiem Medium mit verschiedenen Zytokinen stimuliert. Die MMP in den Kulturüberständen wurden zymographisch erfaßt und semiquantifiziert.

Im Gelatine-Zymogramm (obere Reihe) stellt die Bande bei ca. 105 kD die Pro-Form der MMP-9 dar, bei 66 kD die Pro-Form von MMP-2. Die aktiven Formen der MMP-9 (86 kD) und MMP-2 (62 kD) sind nicht nachweisbar. Auf dem Casein-Zymogramm (untere Reihe) wird eine Metalloprotease bei 57 kD durch TNF- α und IL-17 induziert. (Stimulierungen: -: unstimuliert, T10: TNF- α 10 U/ml, T50: TNF- α 50 U/ml, T100: TNF- α 100 U/ml, IF10: IFN- γ 10 U/ml, IF50: IFN- γ 50 U/ml, IF100: IFN- γ 100 U/ml, IL-4: 100 U/ml, IL-10: 50 U/ml, IL-2: 50 U/ml, IL-17: 200 U/ml). Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel aus 3 Experimenten.

Da für die Aktivität der MMP ihr Verhältnis zu ihren natürlichen Inhibitoren, den TIMP, wichtig ist, wurde im reversen Zymogramm deren Menge auch semiquantitativ bestimmt und die Netto-Aktivität mit einem künstlichen, Fluoreszenzmarker-gequenchten Substrat bestimmt. Im reversen Zymogramm zeigte sich eine TIMP-2-steigernde Wirkung durch TNF- α , IL-4 und IL-10. IFN- γ führte in der Regel zu keiner Veränderung der TIMP-2-Expression. TIMP-1 konnte nur durch IL-17 in nachweisbaren Mengen induziert werden, während TIMP-2 durch IL-17 gehemmt wurde (Ergebnisse nicht dargestellt).

Peptid-1, das als Substrat für die MMP im Fluoreszenzassay eingesetzt wurde, kann von den meisten MMP sehr gut gespalten werden (siehe 2. Material und Methoden). Es spiegelt daher den im Kulturmedium vorliegende Gesamt-MMP-Pool recht gut wider. Mit Peptid-2 wurden MMP-3-Aktivitäten und in geringerem Maß auch MMP-9-Aktivitäten nachgewiesen. Zu einem starken Übergewicht der MMP führten nur die Zytokine TNF- α und IL-17 (Abb.9). Für IFN- γ und IL-4 deutete sich eine schwache Verminderung der MMP-Aktivität gegenüber Peptid 1 an (Abb.9). Da in diesen Versuchen wie auch in weiteren die mit Peptid-2 gemessene Aktivität auch mit den im Casein-Zymogramm sichtbaren Banden korrelierte, wurde in weiteren Versuchen davon ausgegangen, daß es sich hierbei um MMP-3 handelt.

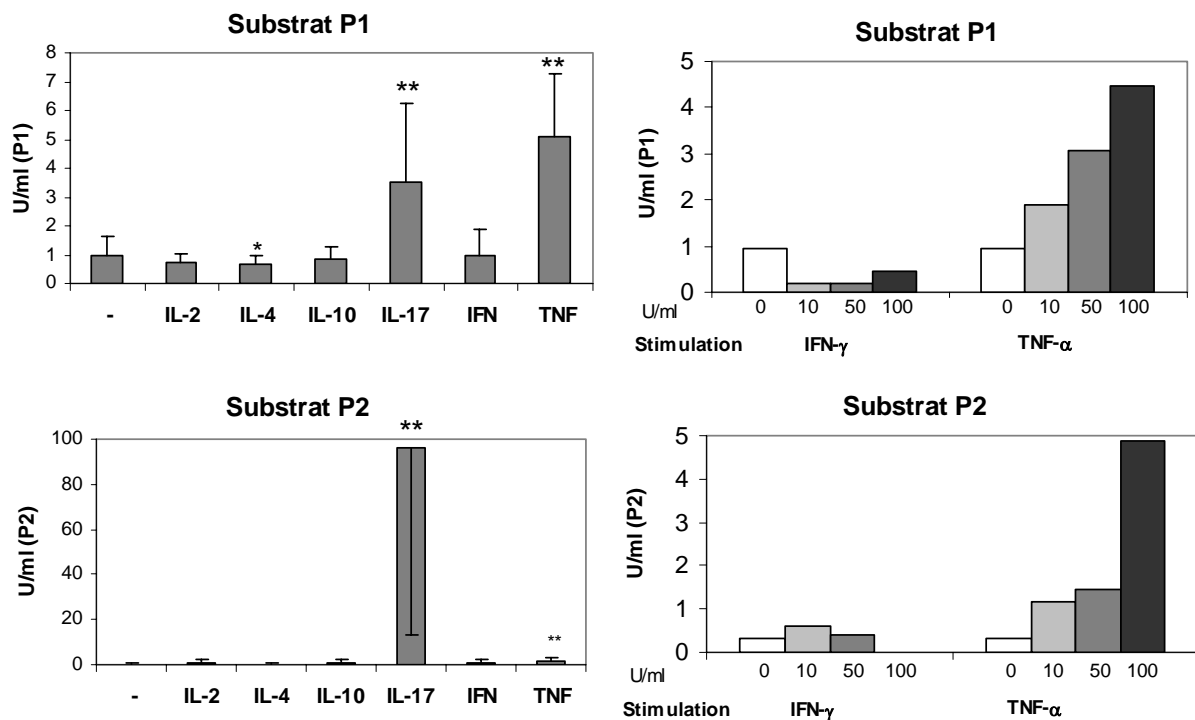


Abb. 9: MMP-Gesamtaktivität in Kulturüberständen nach Stimulation, Fluoreszenzassay

Substratumsatz von Peptid 1 (P1, oben) und Peptid 2 (P2, unten) durch MMP nach Aktivierung mit APMA in Kulturüberständen von SZ (SZ aus arthritischen (7d AIA) und normalen Mäusen) nach 48 h Stimulation mit verschiedenen Zytokinen. Links: Stimulation mit verschiedenen Zytokinen (IL-2: 50 U/ml; IL-4: 100 U/ml; IL-10: 50 U/ml; IL-17: 200 U/ml; IFN- γ : 100 U/ml; TNF- α : 100 U/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte aller Versuche, die Standardabweichungen von einer Stichprobe und Signifikanzen gegen unstimulierte SZ (-), gekennzeichnet mit * (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Rechts: konzentrationsabhängige MMP-Induktion in SZ (7d AIA), repräsentatives Beispiel von 2 Versuchen.

Die Grundaktivität der SZ ohne Stimulation lag im Fluoreszenzassay relativ niedrig, so daß stimulierende Wirkungen stärker zum Ausdruck kamen als hemmende. Aus diesem Grund wurden die folgenden Versuche mit LPS-, IL-1 β - oder TNF- α -stimulierten SZ durchgeführt, da diese Stimulanzien zu einer stark erhöhten MMP-Sekretion führen, so daß auch inhibierende Wirkungen besser nachgewiesen werden können.

3.1.2 Einfluß von IFN- γ auf stimulierte Synoviozyten

Da insbesondere für das IFN- γ sowohl proinflammatorische als auch immunsuppressive Funktionen beschrieben sind (Billiau et al., 1998) und die Rolle des Zytokins in der Arthritis noch relativ unklar ist, wurde im folgenden untersucht, ob IFN- γ auch suppressive Effekte auf SZ ausüben kann. Da SZ im unstimulierten Zustand nur geringe Mengen an NO, IL-6, TNF- α , IL-1 β und MMP freisetzen, wurde die Wirkung des IFN- γ auf LPS- (1 μ g/ml), TNF- α - (200 U/ml) oder IL-1 β - (200 U/ml) stimulierte SZ untersucht. Nach 48-stündiger Stimulierung mit oder ohne IFN- γ -Zusatz wurden die freigesetzten Mediatoren im Überstand gemessen.

IFN- γ stimulierte die NO-Sekretion sowohl in allen stimulierten als auch in unstimulierten SZ (Abb.10a). IL-10, das ebenfalls durch alle drei Stimulanzen induziert wurde, wurde in allen Fällen durch IFN- γ -Zusatz inhibiert. Als Beispiel ist die Stimulierung und Inhibierung in LPS-stimulierten SZ in Abb.10b dargestellt. Die Reaktionen in TNF- α - und IL-1 β -stimulierten Zellen waren insgesamt schwächer, qualitativ jedoch gleichartig (Ergebnisse nicht dargestellt).

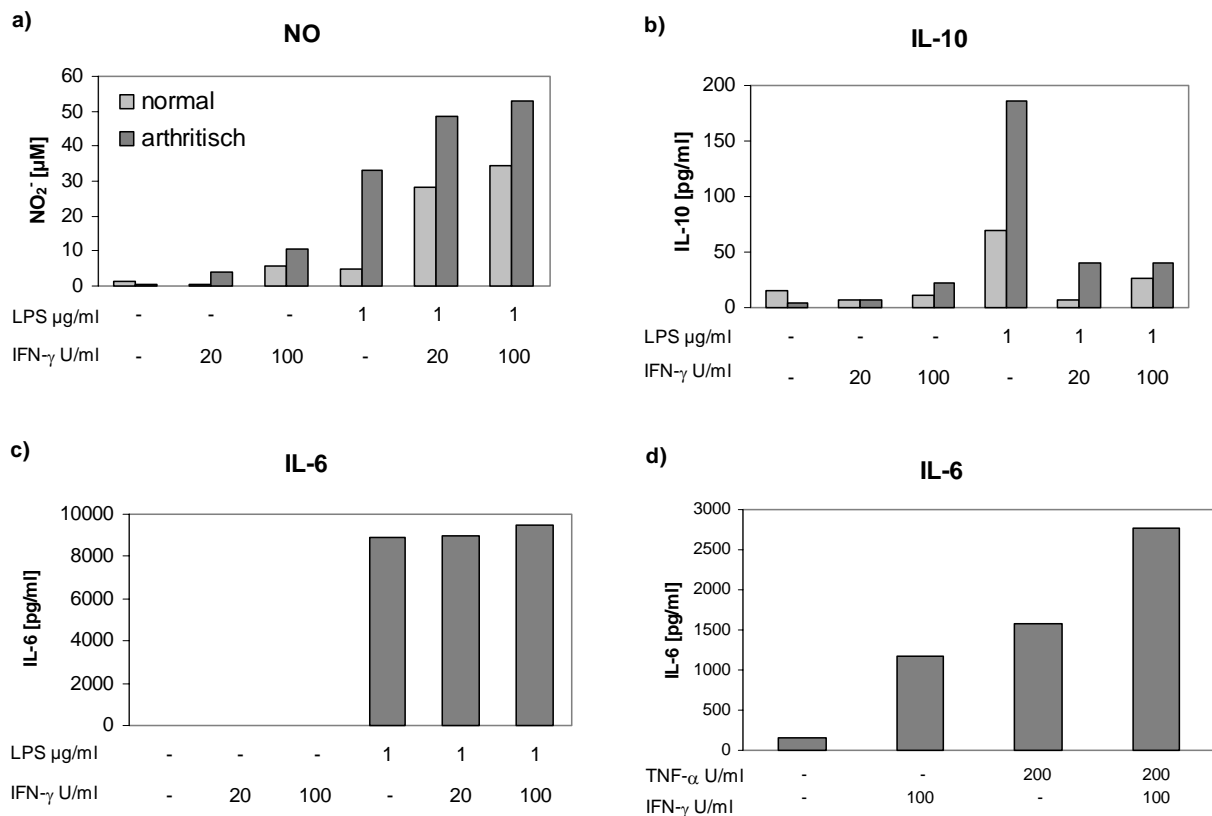


Abb. 10: NO, IL-10 und IL-6 in Kulturüberständen von stimulierten SZ

NO (a), IL-10 (b) und IL-6 (c-d) in Kulturüberständen von SZ aus normalen (helle Balken) oder arthritischen Gelenken (7 d AIA; dunkle Balken) nach 48 h Stimulation mit LPS (a-c) oder TNF- α (d) und verschiedenen Konzentrationen IFN- γ (Zytokine mit ELISA bestimmt, NO mit Griess-Reagenz). Die LPS-induzierte NO-Produktion wurde durch IFN- γ synergistisch verstärkt, während die LPS-induzierte IL-10-Produktion durch IFN- γ gehemmt wurde. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel von 3 Experimenten.

In unstimulierten als auch in TNF- α - und IL-1 β -stimulierten SZ führte IFN- γ zu einer Verstärkung der IL-6-Sekretion (Abb.10d). Die LPS-induzierte IL-6-Produktion in SZ wurde hingegen durch IFN- γ nicht mehr wesentlich verändert (Abb.10 c).

LPS induzierte ferner IL-1 β und TNF- α in SZ, welche in TNF- α - und IL-1 β -stimulierten SZ-Überständen nicht nachweisbar waren. IFN- γ konnte in den LPS-stimulierten SZ die Produktion dieser Zytokine konzentrationsabhängig hemmen, für TNF- α war dies in allen durchgeführten Experimenten nachweisbar, während IL-1 β erst durch höhere IFN- γ -Konzentrationen deutlich gehemmt wurde (Abb.11).

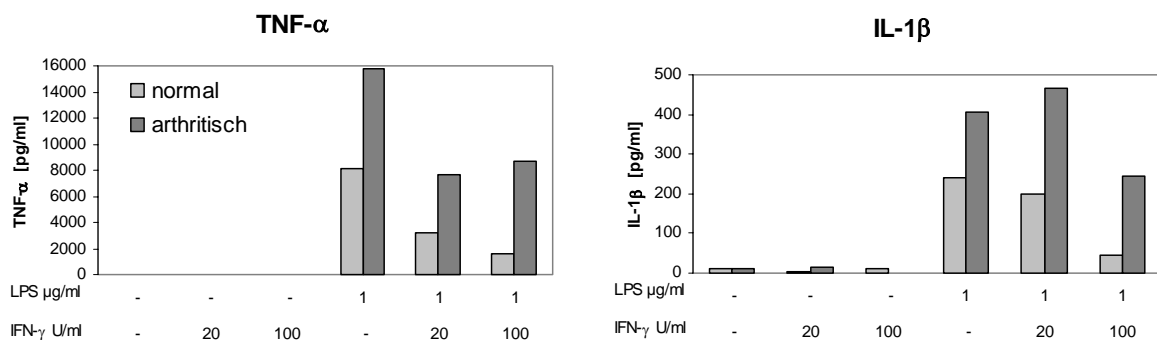


Abb. 11: TNF- α und IL-1 β in Kulturüberständen von LPS-stimulierten SZ

Zytokine in Kulturüberständen von SZ aus normalen (helle Balken) oder arthritischen Gelenken (7 d AIA; dunkle Balken) nach 48 h Stimulation mit LPS und/oder verschiedenen Konzentrationen IFN- γ . Die LPS-induzierte TNF- α -Produktion wurde durch IFN- γ konzentrationsabhängig gehemmt. Für das LPS-induzierte IL-1 β zeigte sich erst bei höheren IFN- γ Konzentrationen eine deutliche Hemmung. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel aus 2 Versuchsansätzen.

Auf die MMP-Sekretion der SZ wirkten LPS, TNF- α und IL-1 β stark stimulierend: sowohl MMP-9 als auch MMP-3 wurden induziert. IFN- γ führte in LPS- und TNF- α -stimulierten SZ zur Senkung der induzierten MMP-9-Sekretion und in allen stimulierten SZ auch zur Inhibierung der MMP-3-Sekretion (Tab. 9 und 10).

TIMP-2 wurde nur durch LPS schwach gehemmt (Tab.9). Durch TNF- α wurde TIMP-2 gesteigert während er durch IL-1 β unbeeinflusst blieb (Tab.10). In den LPS- und TNF- α -stimulierten SZ führte IFN- γ zur Senkung der TIMP-2-Sekretion. TIMP-1 hingegen wurde wiederum nur durch LPS hochreguliert, was jedoch nicht reichte, um die Zunahme der MMP-Aktivität aufzuheben (siehe Fluoreszenzassay, Abb.12).

Tab. 9: MMP- und TIMP-Sekretion von LPS-stimulierten SZ

	unstimuliert	IFN- γ 20 U/ml	IFN- γ 100 U/ml	LPS 1 μ g/ml	LPS + IFN- γ 20 U/ml	LPS + IFN- γ 100 U/ml
MMP-9	-	-	+	++++	+++	++
MMP-3	-	-	-	+++	+++	++
TIMP-1	-	-	-	++	+	-
TIMP-2	+++	++	+++	++	++	+

Stärke der MMP-Banden im Gelatine- (MMP-9) und Casein- (MMP-3) Zymogramm sowie der TIMP-Banden im reversen Zymogramm

(- keine Bande, + schwache Bande, ++ gut sichtbare Bande, +++ starke Bande, ++++ sehr starke Bande)

Tab. 10: MMP- und TIMP-Sekretion von TNF- α - und IL-1 β -stimulierten SZ

	unstimuliert	IFN- γ 100 U/ml	TNF- α 200 U/ml	TNF- α + IFN- γ	IL-1 β 200 U/ml	IL-1 β + IFN- γ
MMP-9	-	+	+++	++	++	++
MMP-3	-	-	++	+	++	+
TIMP-1	-	-	-	-	-	-
TIMP-2	++	++	+++	+	++	++

Stärke der MMP-Banden im Gelatine- (MMP-9) und Casein- (MMP-3) Zymogramm sowie der TIMP-Banden im reversen Zymogramm

(- keine Bande + schwache Bande, ++ gut sichtbare Bande, +++ starke Bande)

Im Fluoreszenzassay zeigte IFN- γ auf die MMP-Aktivität unstimulierter SZ kaum einen Einfluß, auf LPS- und TNF- α -stimulierte SZ wirkte es stark inhibierend (Abb.12). Dies ist vermutlich hauptsächlich einer Gegenregulation der induzierten MMP-9- und MMP-3-Zunahme zuzuschreiben, da in den Zymogrammen die Intensität dieser MMP-Banden mit IFN- γ abnahm (Tab.9). Zwar führte IFN- γ auch zu einer Hemmung der LPS-induzierten TIMP-1-Produktion, dies konnte die Senkung der MMP-Gesamtaktivität im Fluoreszenzassay aber nicht verhindern.

In IL-1 β -stimulierten SZ vermochte IFN- γ zu keiner deutlichen Aktivitätssenkung führen (Abb.12e und f). Die Aktivität gegenüber Peptid 1 war unverändert, was durch die gleich starken MMP-9-Banden im Zymogramm bestätigt wurde (Tab.10). Die Aktivität gegenüber dem MMP-3-Substrat Peptid 2 war nur sehr gering zurückgegangen (Abb.12f) genauso wie auch die MMP-3-Bande im Zymogramm nur leicht inhibiert wurde (Tab.10).

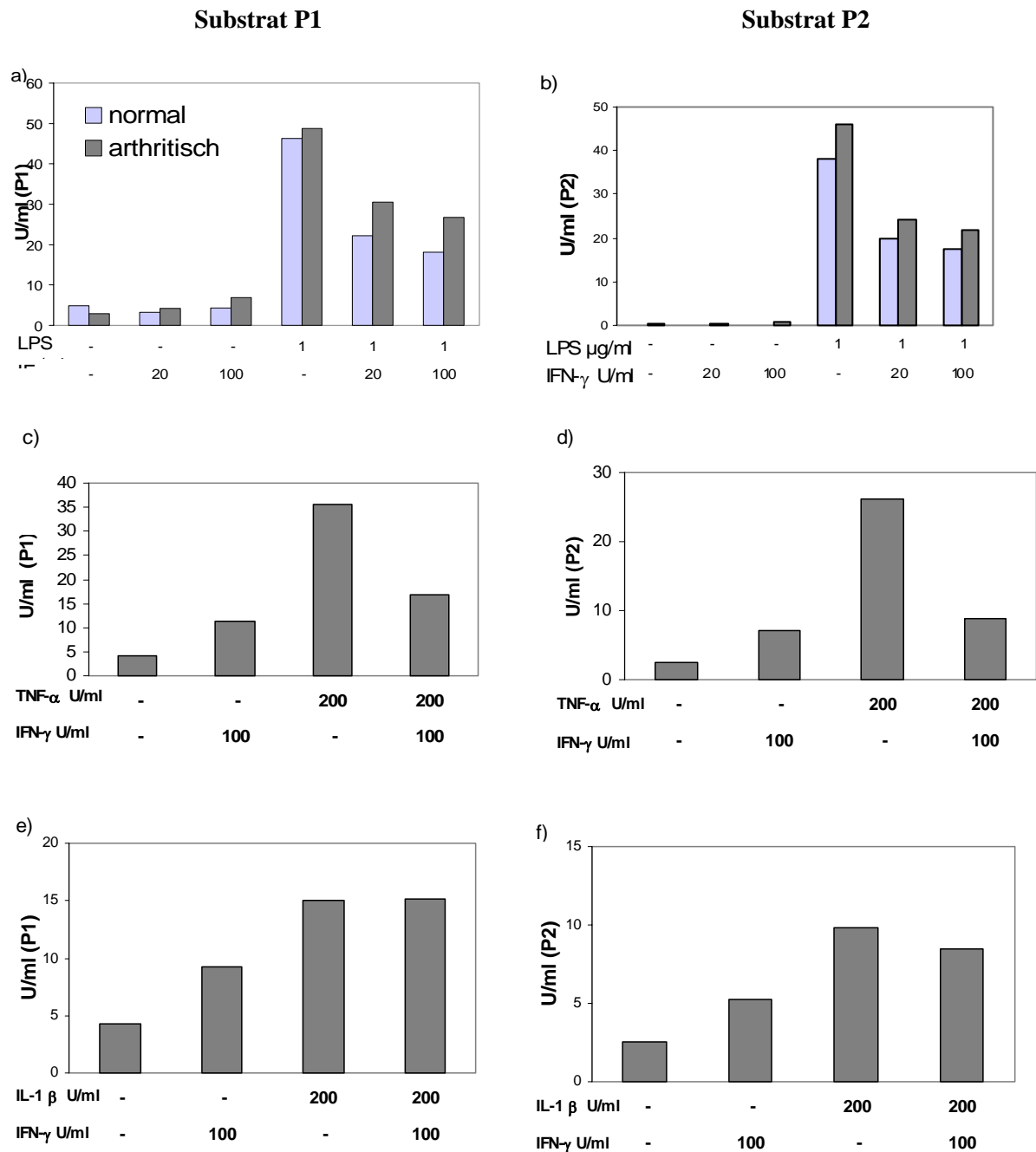


Abb. 12: MMP-Gesamtaktivität in Kulturüberständen von stimulierten SZ, moduliert mit IFN- γ

MMP-Aktivität in Kulturüberständen von SZ aus normalen (helle Balken) oder arthritischen (7d AIA; dunkle Balken) Gelenken nach 48 h Stimulation mit LPS (a+b), TNF- α (c+d) oder IL-1 β (e+f) und verschiedenen Konzentrationen IFN- γ ; Substratumsatz von Peptid 1 (links) und Peptid 2 (rechts) nach Aktivierung der MMP-Pro-Formen mit APMA, bestimmt mittels Fluoreszenzassay. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 (IL-1 β) bzw. 3 (LPS und TNF- α) Experimenten.

3.1.3 Zusammenfassung

Unstimulierte SZ wurden durch die Zytokine IL-17 und TNF- α zur Sekretion von IL-6, NO und MMP stimuliert, während IFN- γ nur zur Stimulation von IL-6 und NO und IL-10 nur zu einer schwachen Stimulierung von IL-6 und TIMP-2 führte (siehe Tab.11).

Auf stimulierte SZ übte IFN- γ eine Reihe von suppressiven Funktionen aus (Tab.12): IFN- γ hemmte die LPS-induzierte IL-1 β - und TNF- α -Sekretion sowie die LPS-, IL-1 β - und TNF- α -induzierte IL-10-Sekretion. Obwohl sowohl die MMP-Sekretion als auch die MMP-Gesamtaktivität durch alle drei Stimulantien (LPS, IL-1 β , TNF- α) erheblich gesteigert wurden, vermochte IFN- γ die Induktion der MMP nur in LPS- und TNF- α -stimulierten SZ stark zu hemmen, jedoch nicht in IL-1 β -stimulierten SZ. Auf die Faktoren NO und IL-6 wirkte IFN- γ hingegen nicht inhibierend, im Gegenteil, bei allen stimulierten SZ kam es zu einer weiteren Erhöhung von NO und in den IL-1 β - und TNF- α -stimulierten SZ auch zur weiteren Erhöhung von IL-6 (Tab.12).

Tab. 11: Regulierung der Parameter NO, IL-6, MMP und TIMP in SZ durch verschiedene Th-Zytokine

Inkubation mit:	NO	IL-6	MMP	TIMP-2
IL-2	→	→	→	→
IL-4	→	→	→	↑
IL-10	→	↑	→	↑
IL-17	↑↑↑↑	↑↑	↑↑	↓
IFN- γ	↑↑↑↑	↑↑	→	→
TNF- α	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑

SZ wurden 48 h mit verschiedenen Zytokinen inkubiert. Im Kulturüberstand wurde NO mit Griess-Reagenz, IL-6 mit ELISA, MMP-Gesamtaktivität im Fluoreszenzassay und die TIMP-2 Sekretion im reversen Zymogramm bestimmt (→ keine deutliche Änderung, ↑ Anstieg um das ca. 1,5-2,5 fache, ↑↑ Anstieg um das 2,5-3,5fache, ↑↑↑ Anstieg um das 3,5-5fache, ↑↑↑↑ Anstieg um über das 5fache).

Tab. 12: Einfluß von IFN- γ auf die Parameter NO, IL-6, MMP und TIMP bei Stimulation der SZ mit LPS, IL-1 β oder TNF- α

Stimulation mit:	NO	IL-6	IL-10	MMP	TIMP-2*
LPS	↑	→	↓	↓	↓
IL-1 β	↑	↑	↓	→	→
TNF- α	↑	↑	↓	↓	↓

SZ, die 48 h mit LPS, IL-1 β oder TNF- α -stimuliert wurden, sind gleichzeitig mit 100 U/ml IFN- γ inkubiert worden. Die Veränderungen der freigesetzten Mengen im Kulturüberstand im Vergleich zu reinen LPS-, IL-1 β - oder TNF- α -stimulierten SZ sind in der Tabelle zusammengefaßt. In den Kulturüberständen wurde NO mit Griess-Reagenz, IL-6 mit ELISA, MMP-Gesamtaktivität im Fluoreszenzassay und die TIMP-2 Sekretion im reversen Zymogramm bestimmt (↓ deutliche Inhibierung des durch die Stimulation induzierten Signals, → keine deutliche Änderung, ↑ deutlicher Anstieg (über das 1,5fache)).

* Die Stimulation mit LPS und IL-1 β führte im Gegensatz zur Stimulation mit TNF- α nicht zur Verstärkung der TIMP-2-Bande.

3.2 Kokultur von Synoviozyten mit stimulierten T-Zellen

3.2.1 Modulation der Synoviozytenaktivität durch *in vitro* stimulierte CD4⁺ und CD4⁻ T-Zellen

Es gibt viele Hinweise dafür, daß Th-Zellen (CD4⁺), jedoch nicht zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) am Pathogenese-prozeß der RA beteiligt sind (Petrow et al., 1996a). Es sollte daher untersucht werden, ob es auch *in vitro* Hinweise dafür gibt, daß CD4⁺ Th-Zellen aus arthritischen Mäusen Synoviozyten stärker stimulieren können als CD4⁻ T-Zellen. Für die Untersuchungen wurden polyklonal stimulierte T-Zellen verwendet, da diese den Autoantigen-stimulierten T-Zellen im Synovium wahrscheinlich am nächsten kommen. Mononukleäre, von adhären-ten Zellen abgereicherte Zellen (MNZ), gewonnen aus Lymphknoten und Milzen arthritischer Mäuse (7d AIA), wurden mit Magnetobeads in CD4⁺ und CD4⁻ Populationen aufgetrennt, mit PMA und Ionomycin für 5 h stimuliert, dann für 3 Tage in RPMI mit 10 % FCS und 10 U/ml IL-2 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in serumfreiem DMEM für 48 h mit SZ aus gesunden oder arthritischen Mäusen kokultiviert. Im Überstand wurden NO, IL-6, TNF- α , IL-1 β , PGE₂ und MMP-Aktivitäten als Maß für die Aktivierung der SZ sowie die Th-Zytokine IL-2, IL-4, IFN- γ und IL-17 gemessen. Die Veränderung der VCAM-1-Expression wurde mit Zell-ELISA bestimmt. Mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) wurden außerdem die Kontaktstellen zwischen SZ und CD4⁺ Th-Zellen dargestellt.

In REM-Aufnahmen erkennt man an den Kontaktstellen häufig lappige Ausläufer der Th-Zellen, die an die Oberfläche der SZ binden (Abb.13). Die SZ weisen an einigen Stellen verdickte Kronen mit vielen Mikrovilli (Filopodia) auf, während sie an den restlichen Stellen eine sehr glatte Oberfläche haben. Auf diesen Kronen sitzen die Th-Zellen besonders häufig.

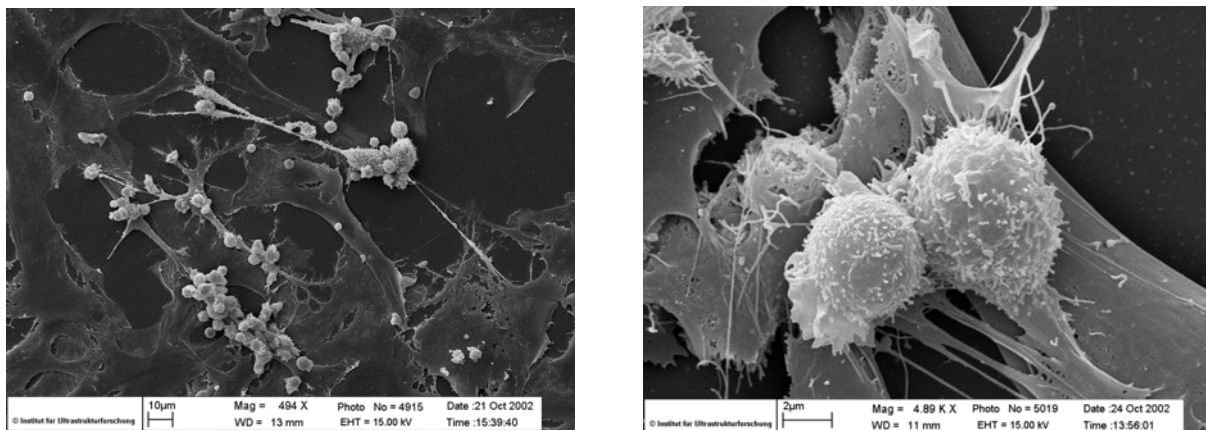


Abb. 13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von SZ mit stimulierten Th-Zellen

SZ aus arthritischen Gelenken (7d AIA) wurden für 48 h mit stimulierten Th-Zellen kokultiviert. Anschließend wurde der Zellrasen gewaschen, so daß nur die adhätierenden Th-Zellen auf dem SZ-Zellrasen haften blieben, dann mit Glutaraldehyd fixiert und für die REM Aufnahmen präpariert. Die Th-Zellen sind gehäuft auf den Mikrovilli-Kronen der Synoviozyten zu finden (links). Sie zeigen Ausläufer, die zu den Synoviozyten einen Kontakt bilden oder auch untereinander Verbindungen aufbauen (rechts).

a) Zytokine, NO und PGE₂

Der Zellkontakt mit CD4⁺ Zellen führte zu einer deutlichen Erhöhung der IL-6- und NO-Freisetzung, was einer Aktivierung der SZ entspricht (Abb.14). Die im ELISA gemessenen IL-6-Mengen waren proportional zu den im Bioassay gemessenen IL-6-Aktivitäten (Ergebnisse nicht dargestellt). TNF- α war in dem dargestellten Experiment ebenfalls vermehrt im Kokulturüberstand mit CD4⁺ Zellen zu finden (Abb.14). In anderen Experimenten waren die Werte für TNF- α allerdings meistens unter der Nachweisgrenze. IL-1 β ließ sich in keinem Fall nachweisen. Prostaglandin E₂ (PGE₂) wurde von SZ in hohem Maße gebildet und konnte nur durch stimulierte CD4⁺ T-Zellen stark gehemmt werden. Stimulierte CD4⁺ Zellen dagegen steigerten die PGE₂-Sekretion in SZ. Die SZ aus den arthritischen Mäusen bildeten häufig mehr NO, PGE₂ und IL-6. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellpräparationen und den Passagenanzahlen allgemein sehr hoch, was auf eine relativ starke Heterogenität der SZ in den Kulturen hinweist. Der direkte Vergleich verschiedener T-Zell-Populationen wurde daher immer in Bezug auf eine bestimmte SZ-Charge durchgeführt. Aus diesem Grund sind in den Abbildungen stets Ergebnisse eines Versuches dargestellt, der die typischen Reaktionen widerspiegelt, die sich im Prinzip in anderen Kokulturen reproduzieren ließen. Durch die starke Varianz der Werte zwischen den Versuchsansätzen war allerdings eine Berechnung von Signifikanzen nicht durchführbar.

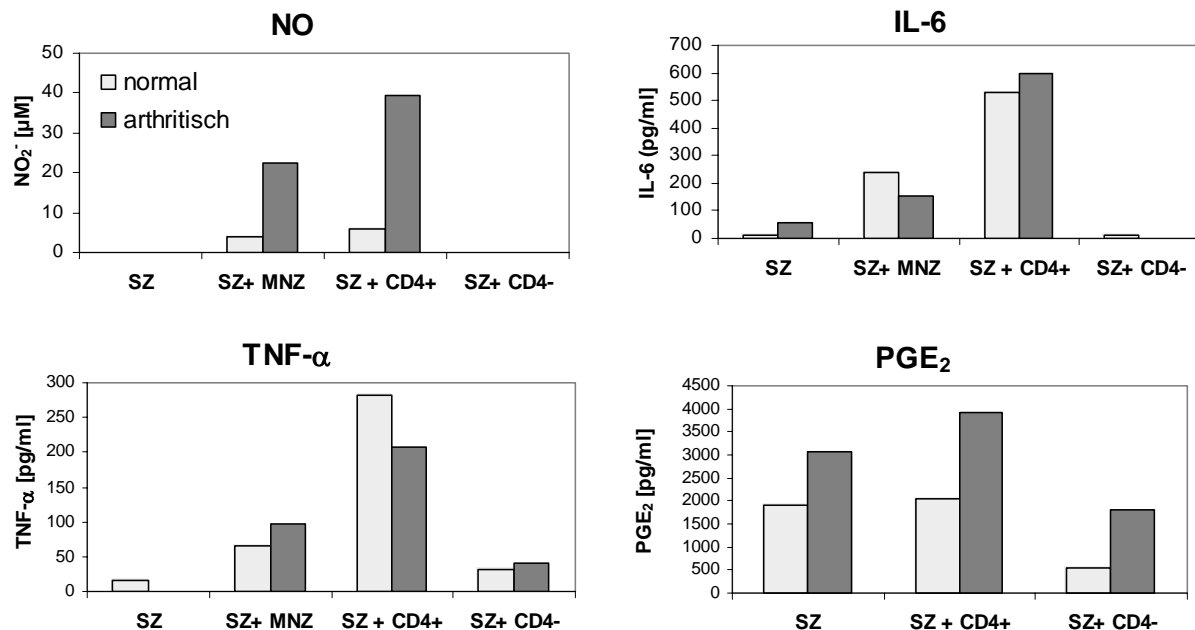


Abb. 14: Zytokine, NO und PGE₂ in Kokulturüberständen von SZ mit stimulierten T-Zellen

Mononukleäre Zellen (MNZ) wurden aus Milzen von C57BL/6-Mäusen mit 7d AIA gewonnen, mit MACS-Beads in CD4⁺ und CD4⁻ Populationen getrennt und für 5 h mit PMA+Ionomycin stimuliert. Nach weiteren 3 Tagen Kultivierung in RPMI+FCS wurden die Zellen gewaschen und für die Kokultur eingesetzt. 1×10⁶ MNZ, CD4⁺ bzw. CD4⁻ Zellen wurden mit 1×10⁵ SZ aus normalen (helle Säulen) oder arthritischen Mäusen (dunkle Säule) in 24-Well Platten für 48 h in serumfreiem DMEM kokultiviert. Als Vergleich wurden SZ ohne T-Zellen (SZ) kultiviert. IL-6, TNF- α und PGE₂ wurden mittels ELISA bestimmt, NO indirekt durch Messung des NO₂⁻ mit Griess-Reagenz. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 3 Experimenten.

Tendenziell verhielten sich die SZ aus arthritischen und gesunden Gelenken sehr ähnlich, so daß eine Aktivierung über spezifische TCR/MHC-vermittelte Mechanismen, die nur mit SZ aus arthritischen Mäusen zu erwarten wären, eher unwahrscheinlich ist.

b) VCAM-1

VCAM-1, ein Adhäsionsmolekül, das in der RA verstärkt exprimiert wird, fördert die Migration von Entzündungszellen ins Gelenk. Bei Kokultur von SZ mit CD4⁺ Th-Zellen war VCAM-1 mittels Zell-ELISA verstärkt nachweisbar (Abb. 15). Dabei war es unerheblich, ob die Th-Zellen aus Milzen oder Lymphknoten stammten. Für die Beurteilung der VCAM-1-Expression ist jedoch auch die Zellproliferation in der Kultur zu berücksichtigen. Die Zellzahl nach der Kultur wurde daher über Kristallviolett-Färbung bestimmt. Es wurde dabei offensichtlich, daß nach der Kokultur eine höhere Zellzahl vorlag als nach der Monokultur der SZ, so daß die höheren VCAM-1-Meßwerte nach der Kokultur auch auf eine höhere Zellzahl zurückzuführen sind. Relativ gesehen nahm der Meßwert für VCAM-1 von der Monokultur zur Kokultur aber wesentlich stärker zu als die Zellzahl, so daß davon ausgegangen werden kann, daß auch eine erhöhte Expression des VCAM-1 auf den einzelnen Zellen durch die Kokultur induziert wird. Die CD4⁻ Zellen führten tendenziell sowohl zu einer geringeren Zunahme von VCAM-1 als auch der Zellzahl. Die Unterschiede zu den Kokulturen mit CD4⁺ Zellen erreichten allerdings keine Signifikanz.

Als Kontrolle wurden reine SZ mit 50 U/ml IFN- γ stimuliert, was in diesem Fall zu keiner veränderten Zellzahl führte (in anderen Kulturen war allerdings häufig eine Abnahme der Zellzahl aufgetreten) und das VCAM-1-Signal steigerte.

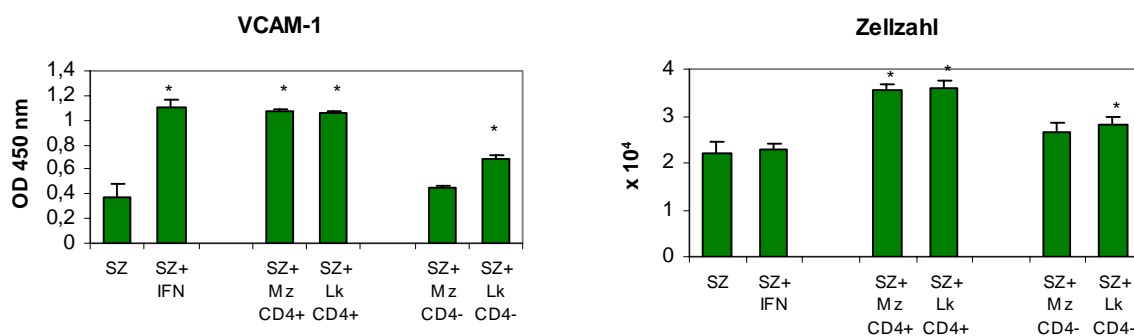


Abb. 15: VCAM-1 und Zellzahl nach Kokultur

Nach 48-stündiger Kultur der SZ (7d AIA) mit CD4⁺ und CD4⁻ Zellen aus Milzen (Mz) oder Lymphknoten (Lk) aus arthritischen Tieren wurde die Menge des exprimierten VCAM-1 auf der Zelloberfläche mittels Zell-ELISA gemessen. Für einen Bezug auf die Zellmenge wurde die Zellzahl über Messung von gebundenem Kristallviolett bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 2 Versuchen. Es sind die Mittelwerte von 5 parallelen Ansätzen mit Standardabweichung angegeben. Signifikante Unterschiede zu unstimulierten SZ sind mit * gekennzeichnet (* p ≤ 0,05).

c) Matrixmetalloproteasen

Die Zymogramme machen deutlich, daß stimulierte $CD4^+$ T-Zellen SZ auch hinsichtlich der MMP- und TIMP-Sekretion stärker stimulierten als stimulierte $CD4^-$ Zellen (Abb.16). Aber nicht nur quantitative Unterschiede lassen sich erkennen, sondern im Casein-Zymogramm auch qualitative: Während die $CD4^+$ Zellen eine stärkere Freisetzung einer Protease mit einem Molekulargewicht (Mw) um ca. 57 kD bewirkten, stimulierten $CD4^-$ Zellen eher ein Enzym mit caseinolytischer Aktivität und einem Mw von ca. 50 kD. Die Enzymaktivität bei 57 kD ließ sich sowohl mit EDTA als auch mit Phenantrolin hemmen, was auf die Matrixmetalloprotease MMP-3 hinweist. Dagegen ließ sich die Aktivität bei 50 kD in den Kokulturüberständen der $CD4^-$ Zellen weder mit EDTA noch mit Phenantrolin hemmen, d.h. hier kann es sich nicht um eine MMP handeln. Im Reversen Zymogramm war in unstimulierten SZ nur TIMP-2 nachweisbar, jedoch nicht TIMP-1. Dieses wurde erst durch Kokultivierung induziert. Auch hier aktivierten die $CD4^+$ Zellen stärker als die $CD4^-$ T-Zellen.

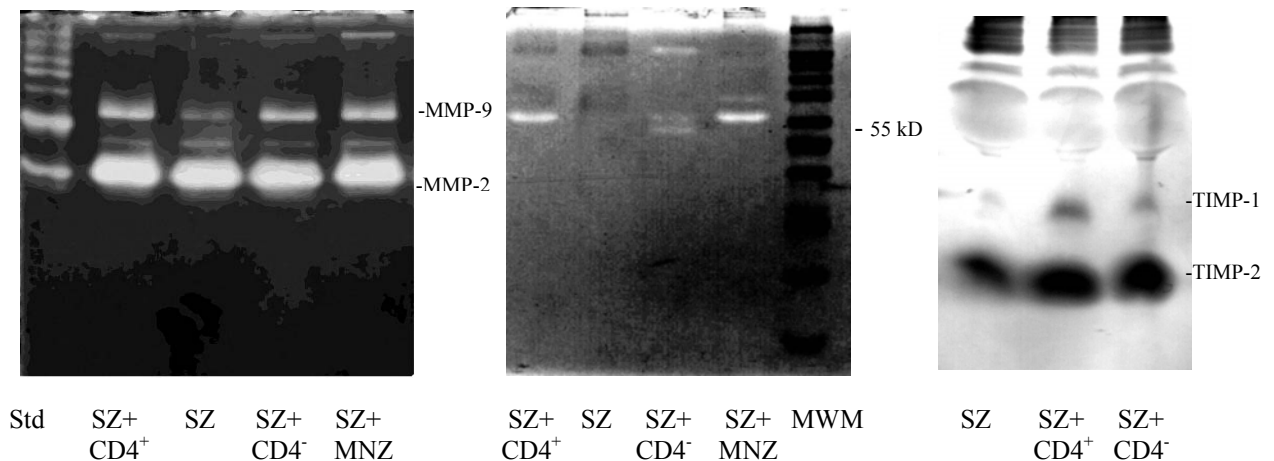


Abb. 16: Zymogramme von Zellkulturüberständen

Synoviozyten (7d AIA) wurden 48 h mit separierten und stimulierten T-Zellen aus arthritischen Mäusen kokultiviert. Die MMP und TIMP in den Kulturüberständen wurden zymographisch ermittelt.

Links: Gelatine-Zymogramm: MMP-9, die als helle Bande bei 105 kD sichtbar ist, wird durch $CD4^+$ Th-Zellen stark und durch $CD4^-$ T-Zellen schwächer induziert. Mitte: Casein-Zymogramm: Die Kokultur mit $CD4^+$ T-Zellen führte zu einer starken Sekretion von MMP-3 bei 57 kD. Rechts: Reverses Zymogramm: $CD4^+$ Zellen führten zur Induktion von TIMP-1 und zur Verstärkung von TIMP-2.

(SZ: Synoviozyten, $CD4^+$: $CD4^+$ Th-Zellen aus Milzen arthritischer Tiere, $CD4^-$: $CD4^-$ T-Zellen aus Milzen arthritischer Tiere, MNZ: unseparierte mononukleäre Zellen aus Milzen arthritischer Tiere, MWM: Molekulargewichtsmarker, Std : humane MMP-2 und MMP-9 als Standard). Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 3 Versuchen.

Da sowohl die MMP als auch deren Inhibitoren induziert oder verstärkt wurden, kann aus den Zymogrammen noch kein Rückschluß auf das Gesamt-Aktivitätspotential im Kulturüberstand gezogen werden. Die Aktivitätsbestimmungen im Fluoreszenzassay mit beiden Substraten (P1 und P2) zeigten jedoch deutlich eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zu den MMP (Abb. 17). Es sind jedoch nur Aktivitäten nach Aktivierung mit APMA nachweisbar. Dies bedeutet, daß die MMP - wie auch im

Zymogramm zu sehen - nur in der Pro-Form im Kulturüberstand vorliegen. Es ist daher zu vermuten, daß im Kulturüberstand kaum Faktoren vorkommen, die zu einer Aktivierung der MMP führen konnten. Kontrolltests mit EDTA, die zu einer Hemmung der MMP-Aktivitäten führten, bezeugten, daß die nachgewiesenen Aktivitäten nur auf Metalloproteasen zurückzuführen sind.

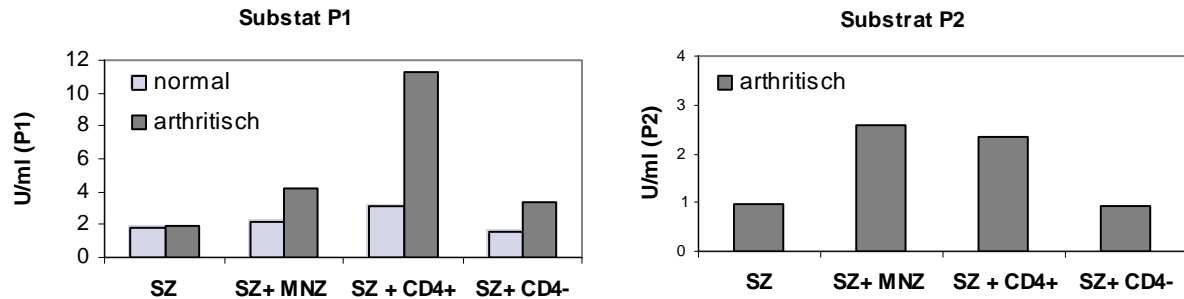


Abb. 17: MMP-Gesamtaktivität in Kokulturüberständen, Fluoreszenzassay

Nach 48 h Kokultur von Synoviozyten aus normalen (helle Balken) oder arthritischen (7d AIA, dunkle Balken) Gelenken mit stimulierten MNZ, CD4⁺ und CD4⁻ Zellen aus Milzen von AIA-Mäusen (7d AIA) wurden die MMP-Gesamtaktivitäten nach Aktivierung mit APMA mit den Substraten Peptid 1 (P1, links) und Peptid 2 (P2, rechts) im Fluoreszenzassay gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 3 Experimenten.

d) Th-Zytokine IL-2, IL-4, IFN- γ und IL-17

Die CD4⁺ und CD4⁻ T-Zellen produzierten IL-2 in gleichem Maße in der Kokultur (Abb.18). Daher lassen sich die Unterschiede bei der Aktivierung der SZ nicht auf eine unterschiedliche Aktivität der T-Zellen zurückführen. IL-17 und IFN- γ sind in den Kokulturüberständen mit den CD4⁺ Zellen allerdings wesentlich höher als in denen mit CD4⁻ Zellen (Abb.18).

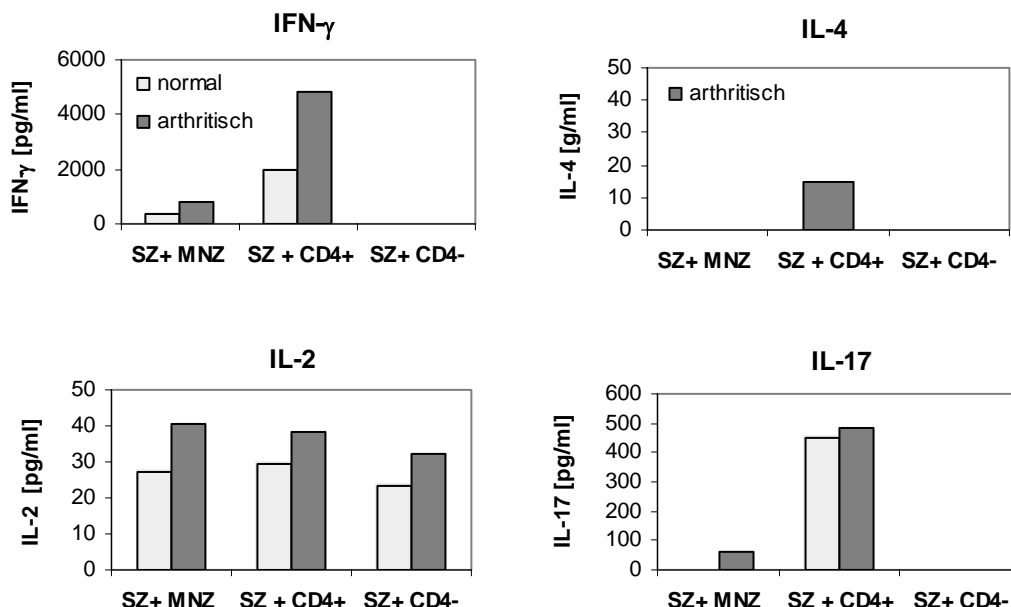


Abb. 18: Th-Zytokine IL-2, IL-4, IFN- γ und IL-17 in den Kokulturüberständen

Die unseparierten MNZ und die in CD4⁺ und CD4⁻ separierten Zellen wurden aus Milzen arthritischer Tieren gewonnen und mit SZ aus normalen oder arthritischen Gelenken 48 h kultiviert. Die Zytokine wurden mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 Versuchen.

Da IL-17 und IFN- γ SZ zur vermehrten IL-6-, NO- und PGE₂-Produktion stimulieren können, könnten diese Zytokine wichtige Parameter bei der Aktivierung der SZ sein. Zur MMP-Stimulierung könnte ebenfalls das IL-17 beigetragen haben. Ob diese Zytokine erst durch Anregung in der Kokultur produziert werden und ob die Ausgangswerte in CD4⁺ und CD4⁻ T-Zellen ohne Kokultur schon unterschiedlich sind, sollte deshalb in weiteren Versuchen geklärt werden (siehe 3.2.2).

Zusammenfassung

Die stimulierten CD4⁺ Th-Zellen waren in der Lage, SZ stark zu aktivieren, welches zu einer verstärkten Sekretion von NO, IL-6, PGE₂, MMP und TIMP führte. Eine Steigerung der Netto-MMP-Gesamtaktivität im Fluoreszenzassay deutet auf eine Verschiebung des MMP/TIMP-Gleichgewichtes zu MMP hin. Auch die VCAM-1-Expression und die Zellzahl waren nach der Kokultur erhöht. Die CD4⁻ T-Zellen konnten Synoviozyten hingegen nur schwach stimulieren: NO und IL-6 wurden nicht beeinflusst und MMP und VCAM-1 wurden nur geringfügig erhöht. Eine Verschiebung des MMP/TIMP-Gleichgewichtes konnte nicht festgestellt werden. Die PGE₂-Sekretion wurde durch die CD4⁻ T-Zellen sogar stark inhibiert.

3.2.2 Modulation der Zytokinsekretion von stimulierten T-Zellen durch Synoviozyten

Da die Th-Zellen in allen Experimenten lebend mit den SZ kokultiviert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch umgekehrt die T-Zellen in ihrer Zytokinsekretion durch Kontakt mit SZ beeinflusst werden. Der Einfluß der SZ auf stimulierte T-Zellen wurde daher durch Kokultur mit T-Zellen, die zuvor mit PMA und Inomycin stimuliert wurden, untersucht. Als Vergleich dienten genauso behandelte T-Zellen, die allein kultiviert wurden (Monokulturen).

Die Sekretion der Th-Zell-Zytokine IFN- γ und IL-2 wurden durch Kokultur mit SZ deutlich sowohl in den CD4⁺ Zellen als auch in den CD4⁻ Zellen gehemmt (Abb.19). Die CD4⁻ Zellen aus Milzen bildeten allerdings bereits primär weniger IFN- γ und IL-2, so daß diese Zellen anscheinend weniger aktiviert vorlagen und deshalb möglicherweise auch zu einer geringeren Aktivierung der SZ führten.

Die Hemmung der Zytokinsekretion ist jedoch nicht nur auf die typischen Th1-Zytokine beschränkt, sondern ließ sich auch für IL-4 nachweisen. IL-17 hingegen, das von Memory-Zellen gebildet wird, wurde meistens nur gering exprimiert und dann auch nur geringfügig gehemmt. In zwei von fünf Versuchen deutete sich sogar eine leichte Stimulierung der IL-17-Sekretion in CD4⁺ Th-Zellen an. Von CD4⁻ Zellen wurden keine nachweisbaren IL-17-Mengen sezerniert. Für IL-10 ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse, da es nicht in allen Kokulturansätzen gehemmt wurde. Eine Ursache könnte in der Heterogenität der SZ liegen, d.h. bei einem höheren Prozentsatz von makrophagenähnlichen SZ könnten diese zu einem zusätzlichen IL-10-Signal geführt haben, welches die Hemmung der IL-10-Sekretion von Th-Zellen überdeckt.

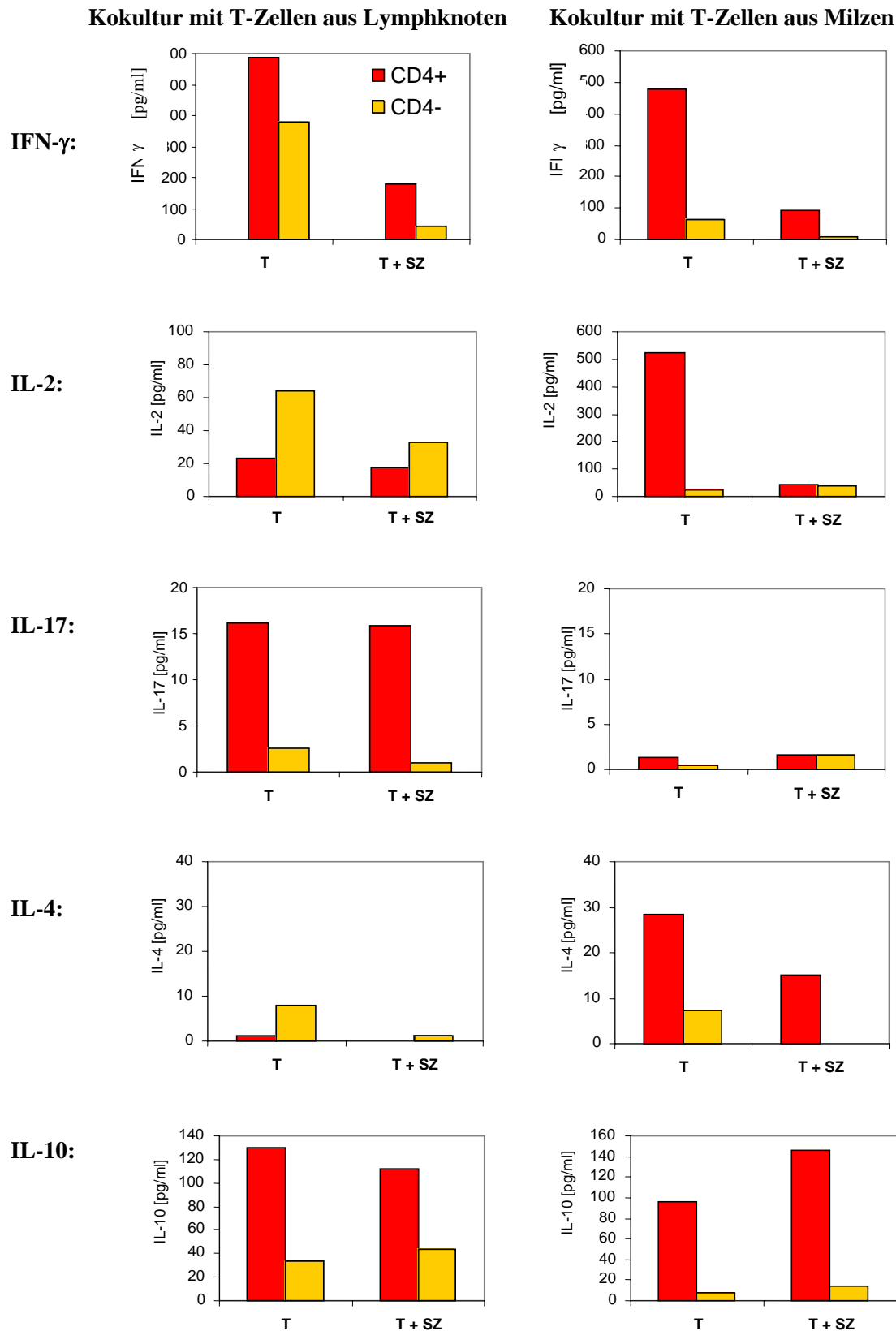


Abb. 19: Regulierung der Zytokin-Sekretion in stimulierten T-Zellen durch Kokultur mit SZ

Aus Lymphknoten (linke Reihe) und Milzen (rechte Reihe) wurden CD4⁺ (dunkle Balken) und CD4⁻ (helle Balken) Zellen aus mononukleären Zellen separiert, mit PMA+Ionomycin 5 h stimuliert, 3 weitere Tage kultiviert und dann allein (T) oder in Kokultur (T+SZ) mit arthritischen SZ kultiviert. Die Zytokine wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 Versuchen.

3.3 Beeinflussung der Apoptose von Synoviozyten durch Kontakt mit verschiedenen Matrices und Kokultur mit stimulierten mononukleären Zellen

Um die in der Kokultur gebildeten Faktoren in ausreichenden Mengen zu akkumulieren, wurden die Zellen für 48 h kultiviert. Dabei besteht die Gefahr, daß die Zellen bei so langer Kultivierung im serumfreien Medium in Apoptose übergehen können. Deshalb sollte überprüft werden, wie hoch die Apoptoserate in SZ und in T-Zellen nach der Kultur bzw. Kokultur ist. Da für den Versuchsansatz sehr viele Zellen benötigt werden, die Ausbeute an CD4⁺ Zellen aus arthritischen Tieren aber relativ gering ist, wurden die Versuche mit mononukleären Zellen durchgeführt, die von adhärennten Zellen abgereichert wurden (MNZ). Diese Zellen wurden vor der Kokultur polyklonal stimuliert. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Apoptose durch Kultivierung auf einer mit Matrix beschichteten Platte verringert werden kann. Als Matrices wurden Kollagen I, Laminin, Fibronectin und Poly-D-Lysin getestet, als Vergleich diente eine unbeschichtete Platte. Nach 48 h Kokultur im serumfreien Medium wurde der Anteil an apoptotischen Zellen mit dem Apo-Direct Kit (Pharmingen) in der Durchflußzytometrie bestimmt. Da sich die Zelltypen im FACS gut durch ihre Größe unterscheiden lassen, konnte der Anteil der apoptotischen Zellen des jeweiligen Zell-Typs durch Anlegen entsprechender Gates getrennt ausgewertet werden.

Tab. 13: Anteil der apoptotischen Zellen nach Kultur oder Kokultur auf beschichteten Platten
Angaben in %

Beschichtung	Unbeschichtet	Kollagen I	Fibronectin	Laminin	Poly-D-Lysin
SZ-Monokultur	91	62	60	90	66
SZ in der Kokultur	25,6	8,3	5,8	38,9	20,6
MNZ in der Kokultur	6,2	1,8	1,1	9,4	4,1

Die MNZ-Monokultur wies 36,6 % apoptotische Zellen auf. Dargestellt sind Einzelwerte eines Versuches.

Die SZ waren nach den 48 h in serumfreiem Medium überwiegend in Apoptose übergegangen. Allein durch die Kokultivierung wurden sowohl die apoptotischen MNZ von 36,6 % auf 6,2 % und auch die apoptotischen SZ von 91 % auf 25,6 % reduziert (Tab. 13).

Kollagen und Fibronectin verhinderten die Apoptose in SZ in hohem Maße. Aber auch eine künstliche Beschichtung mit Poly-D-Lysin konnte sie senken. Laminin, das anstelle einer Basalmembran auch im Gelenk vorkommt, hat sogar einen eher fördernden Einfluß auf die Apoptose. Da es jedoch verschiedene Varianten von Laminin gibt und der Hersteller der beschichteten Platten keine weiteren Angaben zum Typ des Laminins geben konnte, kann hier nicht geklärt werden, ob es sich um das gleiche Laminin wie *in vivo* im Gelenk handelt. Auch die MNZ wiesen in den Kokulturen auf den Kollagen- und Fibronectin-beschichteten Platten eine wesentlich geringere Apoptose auf. Wahrscheinlich ist diese Verminderung indirekt durch die verminderte Apoptose der SZ zu erklären, da ein direkter Kontakt mit der Matrix durch den zwischen Matrix und MNZ befindlichen konfluenten Synoviozytenrasen unwahrscheinlich ist.

Bei morphologischer Betrachtung der Zellkulturen zeigten sich ebenfalls erhebliche Unterschiede in den Platten, die nicht mit den apoptotischen Vorgängen in Einklang zu bringen sind. Während auf unbeschichteten und mit Kollagen I und Fibronectin beschichteten Platten ein konfluenter gleichmäßig strukturierter Zellrasen gewachsen ist, sind die Zellen auf den mit Laminin und Poly-D-Lysin beschichteten Platten unregelmäßig verteilt und häufig zu Aggregaten zusammengewachsen (Abb.20).

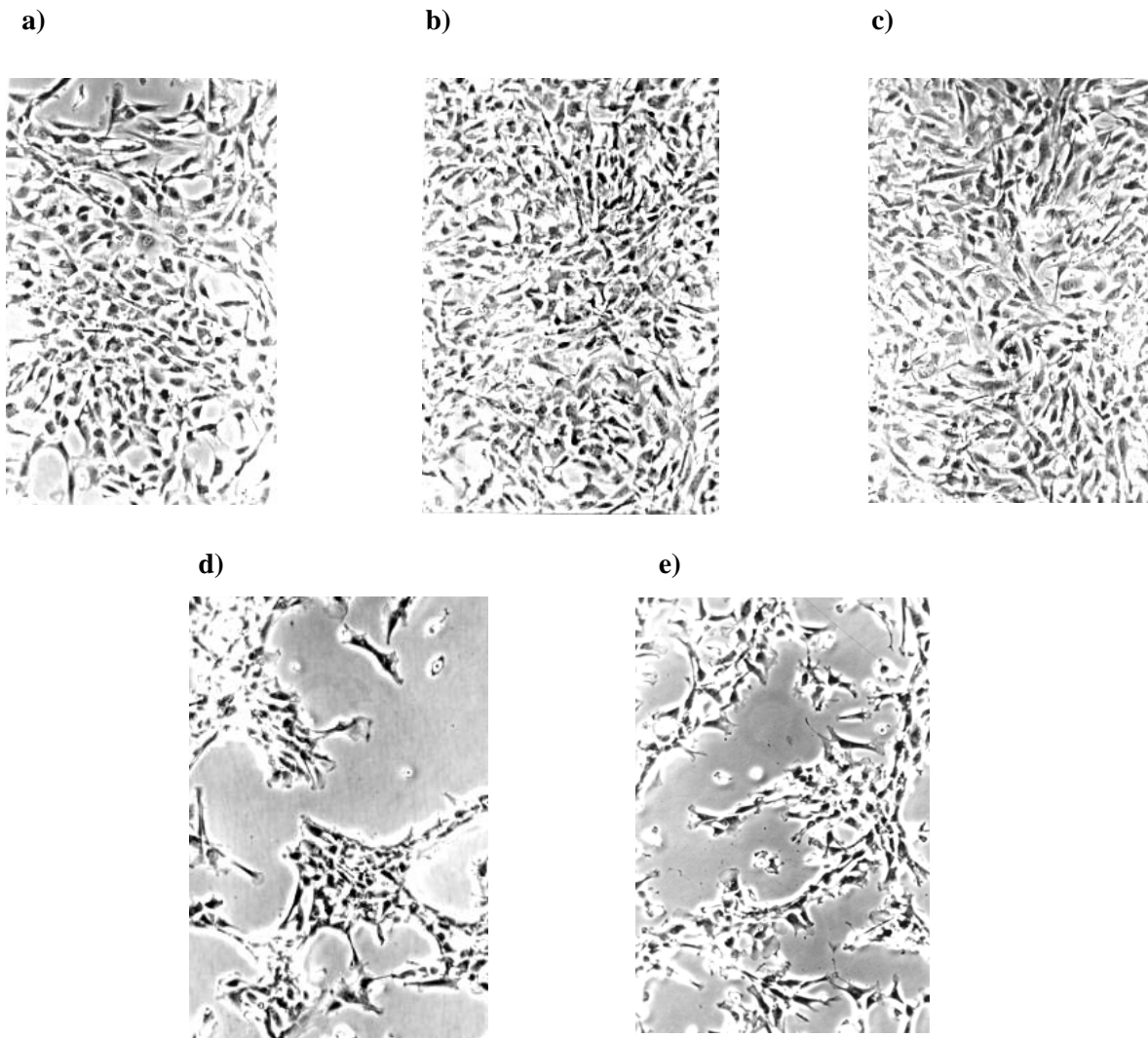


Abb. 20: Phasenkontrast-Aufnahme von SZ-Zellkulturen auf unterschiedlich beschichteten Platten

Synoviozyten nach 24 h Kultivierung auf beschichteten Platten:

a) unbeschichtet, b) Kollagen I, c) Fibronectin, d) Laminin, e) Poly-D-Lysin (30×)

Die längere Vitalität der SZ bei Kokultivierung könnte dazu beigetragen haben, daß in den Kokulturüberständen mehr Zytokine und MMP angereichert werden konnten. Eine Korrelation zwischen den gemessenen Parametern in den Kulturüberständen und der Apoptoserate wurde jedoch nicht gefunden. Insgesamt ergaben sich beim Vergleich der sezernierten IL-6-, NO-, MMP- und TIMP-Mengen nur geringe Unterschiede zwischen den Kokulturen auf den verschiedenen Matrices (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.4 Kokultur von Synoviozyten mit naiven und arthritischen Th-Zellen

3.4.1 **Modulation der Synoviozytenaktivität durch naive und arthritische Th-Zellen**

Die bisherigen Kokulturversuche (Kap. 3.2 und 3.3) wurden mit polyklonal stimulierten T-Zellen durchgeführt, weil es Hinweise dafür gab, daß stimulierte T-Zellen, aber keine ruhenden T-Zellen erhebliche Effekte auf andere Zellen ausüben. So führten z.B. stimulierte T-Zellklone oder deren Zellmembranen zur Induktion von MMP (Miltenburg et al., 1995) und IL-1 β (Li et al., 1995) in Monozyten und zur Inhibierung der Kollagen I- und III-Synthese in Synoviozyten (Rezzonico et al., 1998), während ruhende T-Zellen dies nicht vermochten. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß ruhende T-Zellen ebenfalls Reaktionen in Fibroblasten auslösen können (Yamamura et al. 2001). Aus diesem Grund wurde untersucht, in wie weit naive Th-Zellen die Synoviozytenaktivität beeinflussen können. Dazu wurden Th-Zellen aus normalen Mäusen isoliert und ohne Stimulierung direkt mit Synoviozyten (aus arthritischen oder gesunden Gelenken) kokultiviert. Als Vergleich dienten Th-Zellen aus Milzen oder Lymphknoten von arthritischen Mäusen (7d AIA), die ebenfalls *in vitro* keine weitere Stimulierung erhielten. Zusätzlich wurden auch Th-Zellen aus Mäusen mit chronischer Arthritis gewonnen, deren Aktivität in dieser Phase fast wieder auf Ausgangsniveau gesunken war. Deren Aktivierungspotential wurde verglichen mit Th-Zellen, die aus Mäusen mit einem induzierten Entzündungsschub in der chronischen Phase gewonnen wurden.

a) Zytokine, NO und Prostaglandine

Sowohl naive Th-Zellen als auch Th-Zellen aus arthritischen Mäusen aktivierten SZ, was sich in einer signifikanten Erhöhung von NO und IL-6 äußerte (Abb.21). Im Vergleich zu Th-Zellen aus normalen, gesunden Mäusen führten die Th-Zellen aus arthritischen Mäusen zu einer höheren Steigerung der NO- und IL-6-Produktion, was jedoch für IL-6 statistisch nicht signifikant war (Abb. 21). Auch die Th-Zytokine IL-2 und IFN- γ waren wie erwartet in den Th-Zellen aus den arthritischen Tieren höher und wiesen daher auch in der Kokultur höhere Level auf. Dennoch zeigte sich keine allgemeine Korrelation zwischen IL-6 und IL-2 oder IFN- γ in den Kokulturen.

TNF- α , IL-1 β , IL-4 und IL-17 waren stets unter der Nachweisgrenze. Die IL-10-Werte streuten zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen stark, so daß sich nur eine tendenzielle Erhöhung in der Kokultur mit den Th-Zellen aus den arthritischen Mäusen zeigte (Abb.21).

Interessanterweise führte der Kontakt der SZ mit den Th-Zellen zu einer Senkung der Prostaglandin-Freisetzung. Diese Inhibierung war mit Th-Zellen aus gesunden Tieren stärker als mit Th-Zellen aus arthritischen Tieren. Wie in Kapitel 3.2.1. gezeigt, führten Th-Zellen, die mit PMA stimuliert wurden, zu einer Steigerung der PGE₂-Sekretion. Diese Befunde lassen vermuten, daß die hemmende Funktion durch ruhende, naive Th-Zellen bei einer Stimulierung abgeschwächt wird und daß bei stärkerer Stimulierung sogar aktivierende Faktoren in den Vordergrund rücken.

SZ aus arthritischen und normalen Mäusen zeigten keine unterschiedlichen Reaktionen. Für eine statistische Auswertung wurden deshalb in Abb.21 die Ergebnisse der Versuche mit arthritischen und normalen SZ zusammengefaßt.

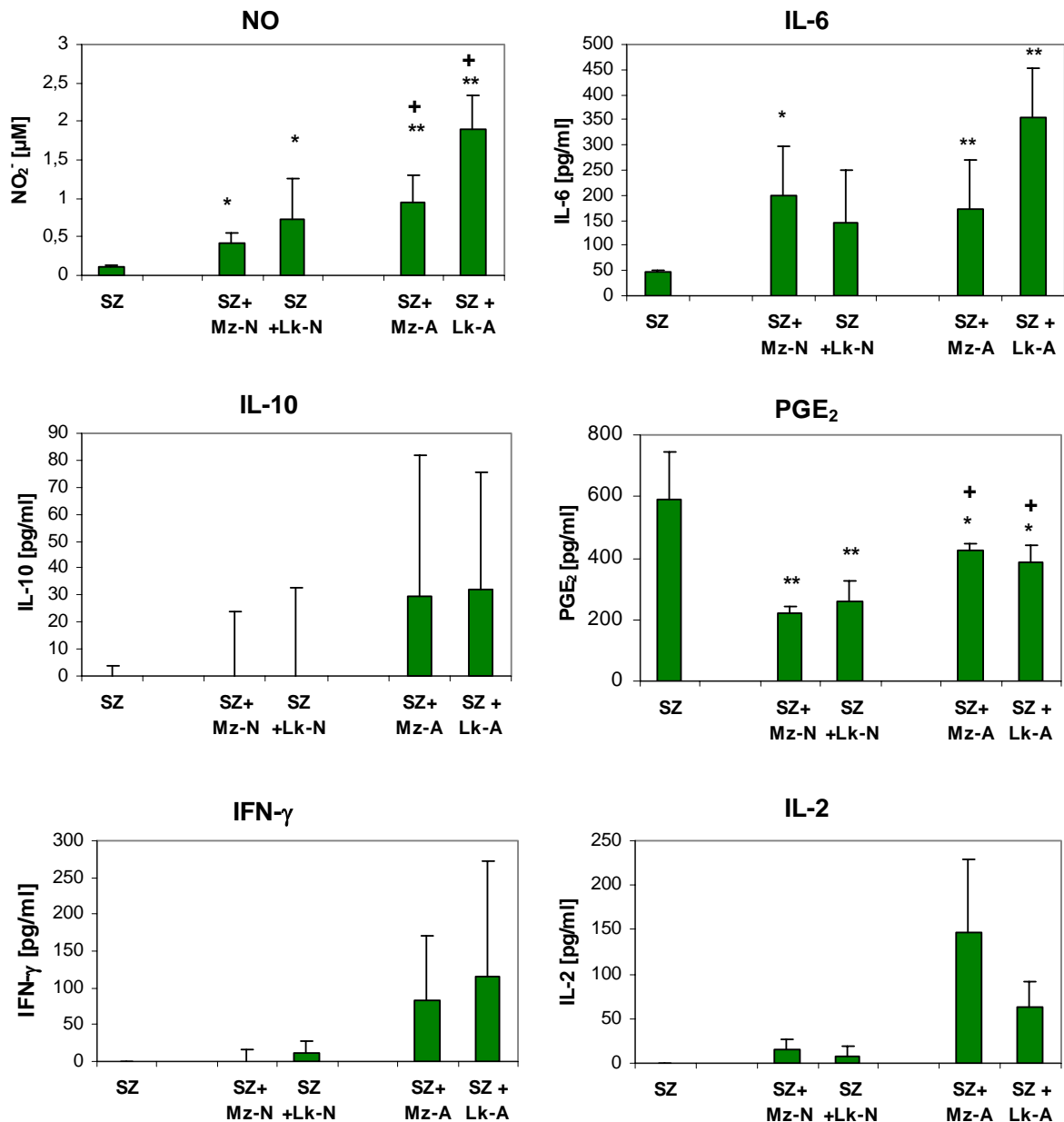


Abb. 21: Modulation der Synoviozytenaktivität durch Th-Zellen aus gesunden und arthritischen Mäusen

Frisch isolierte, nicht aktivierte CD4⁺ Th-Zellen aus Lymphknoten (Lk) oder Milzen (Mz) von gesunden (N) oder arthritischen (7d AIA) (A) Mäusen wurden für 48 h mit SZ in der 4. Passage (aus gesunden oder arthritischen Mäusen) kokultiviert. In den Kokulturüberständen wurden die Parameter NO mittels Griess-Reagenz und IL-6, PGE₂, IL-10, IFN-γ und IL-2 mittels ELISA bestimmt. Zum Vergleich sind die Werte von reinen Synoviozyten-Kulturüberständen (SZ, linke Säulen) dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Versuchen wurden berechnet und dargestellt. Die signifikanten Unterschiede zwischen Kokultur und Synoviozyten-Monokultur wurden mit *, zwischen Kokultur mit Th-Zellen aus arthritischen Mäusen und Kokultur mit Th-Zellen aus gesunden Mäusen mit + gekennzeichnet (*, + p ≤ 0,05; **, ++ p ≤ 0,01).

Th-Zellen aus Mäusen mit einem überlagerten akuten Entzündungsschub (Flare) in der chronischen Phase zeigten ebenfalls eine stärker stimulierende Wirkung auf die IL-6- und NO-Sekretion sowie auch auf die MMP-Aktivität von SZ als Th-Zellen aus chronisch-arthritischen Tieren ohne Entzündungsschub (Abb.22).

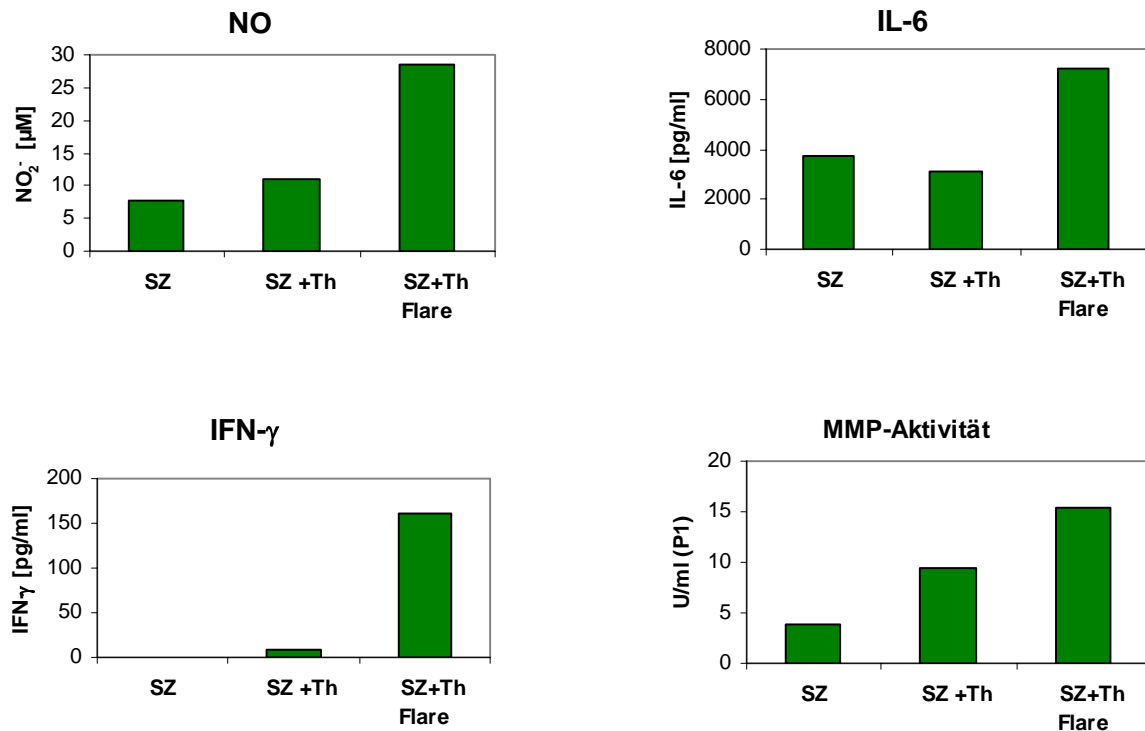


Abb. 22: Modulation der Synoviozytenaktivität durch Th-Zellen aus chronisch-arthritischen Mäusen mit oder ohne akuten Entzündungsschub

CD4⁺ Th-Zellen aus Lymphknoten von Mäusen mit 23-tägiger Arthritis (chronische Phase, Th) und aus Mäusen mit 23-tägiger Arthritis, in denen 2 Tage zuvor durch nochmalige Gabe des Antigens ein Entzündungsschub induziert wurde (Th Flare), wurden mit SZ (7d AIA) 48 h kokultiviert. Im Überstand wurden NO, IL-6 und IFN-γ mit ELISA sowie die MMP-Gesamtaktivität durch Substratumsatz des Peptid 1 nach APMA-Aktivierung im Fluoreszenzassay bestimmt (einmaliger Versuch).

b) VCAM-1-Expression

Die VCAM-1-Expression der arthritischen sowie normalen SZ wurde durch Th-Zellen aus arthritischen Mäusen wesentlich stärker erhöht als mit Th-Zellen aus normalen Mäusen (Abb.23). Jedoch ist auch die SZ-Zellzahl nach Kokultur mit den arthritischen Th-Zellen höher, so daß möglicherweise nur die höhere Zellzahl zu dem höheren VCAM-1-Wert geführt haben könnte. Eine Standardkurve von unstimulierten SZ mit verschiedenen Zellzahlkonzentrationen konnte nicht mitgeführt werden, da die Zellen dafür nicht ausreichten.

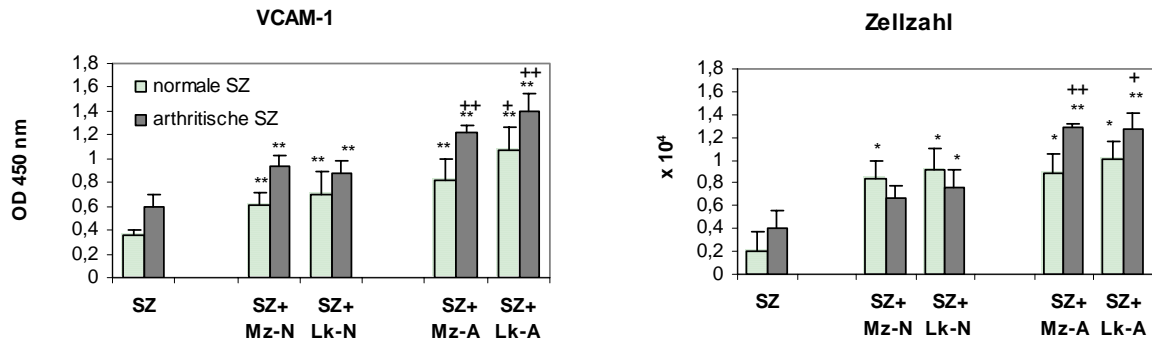


Abb. 23: VCAM-1-Expression der SZ und Zellzahl nach Kokultur mit Th-Zellen aus gesunden und arthritischen Mäusen

CD4⁺ Th-Zellen aus Milzen (Mz) und Lymphknoten (Lk) von gesunden Mäusen (-N) oder arthritischen Mäusen (7d AIA) (-A) wurden mit normalen (helle Balken) oder arthritischen (dunkle Balken) Synoviozyten (SZ) kokultiviert. Die VCAM-1-Expression wurde nach 48 h mit Zell-ELISA gemessen und die Zellzahl mit Kristallviolett bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 Versuchen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf Parallelansätzen wurden berechnet. Die signifikanten Unterschiede zwischen Kokultur und Synoviozyten-Monokultur wurden mit *, zwischen Kokultur mit Th-Zellen aus arthritischen Mäusen und Kokultur mit Th-Zellen aus gesunden Mäusen mit + gekennzeichnet (*, + $p \leq 0,05$; **, ++ $p \leq 0,01$).

c) Matrixmetalloproteasen

Th-Zellen aus arthritischen Tieren stimulierten SZ aus arthritischen Gelenken zu einer stärkeren MMP-9- und MMP-3-Sekretion als Th-Zellen aus normalen Tieren, während umgekehrt die TIMP-2-Sekretion stärker von Th-Zellen aus normalen Mäusen stimuliert wurde (Abb.24). Dies spiegelt sich auch im Fluoreszenzassay wider, in dem eine wesentlich höhere Gesamt-MMP-Aktivität bei Kokultur mit arthritischen Th-Zellen zu beobachten ist, während Th-Zellen aus den gesunden Tieren keine oder allenfalls eine schwache Steigerung der MMP-Gesamtaktivität induzierten (Abb.25). SZ aus normalen Gelenken reagierten in gleicher Weise (Ergebnisse nicht dargestellt).

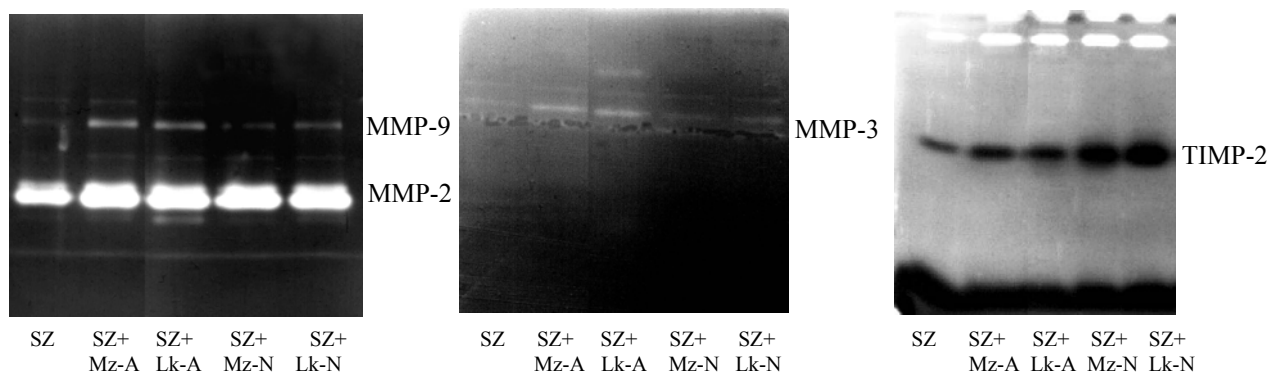


Abb. 24: Zymogramme der Kokulturüberstände von SZ mit Th-Zellen aus gesunden und arthritischen Mäusen

MMP-Aktivitäten in Kokulturüberständen von SZ (7d AIA) mit unstimulierten Th-Zellen aus arthritischen oder normalen Mäusen wurden zymographisch bestimmt.

Links: Gelatine-Zymogramm, oben MMP-9, unten MMP-2; Mitte: Casein-Zymogramm, MMP-3 (57 kD); Rechts: Reverses Zymogramm mit TIMP-2-Bande

(Mz = Th-Zellen aus der Milz; Lk: Th-Zellen aus den Lymphknoten; -A: Th-Zellen aus der arthritischen Mäusen, -N: Th-Zellen aus normalen gesunden Mäusen)

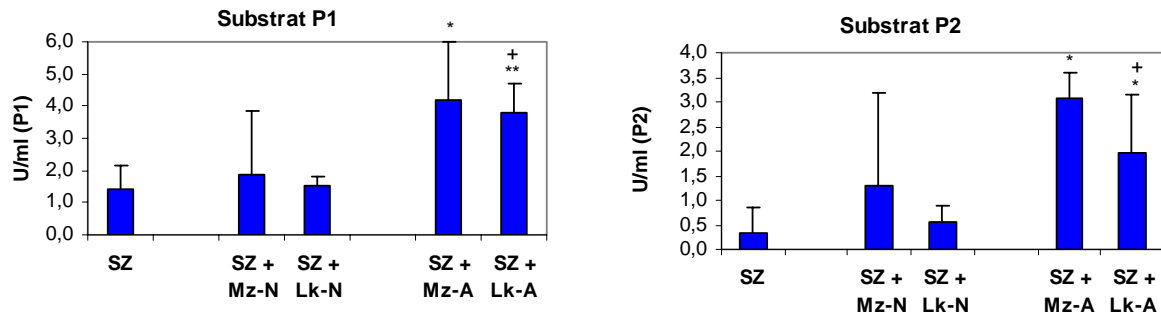


Abb. 25: MMP-Gesamtaktivität in Kokulturüberständen von SZ mit Th-Zellen aus gesunden und arthritischen Mäusen, Fluoreszenzassay

MMP-Gesamtaktivitäten in Kokulturüberständen von SZ (7d AIA) mit unstimulierten Th-Zellen aus normalen oder arthritischen Mäusen wurden nach Aktivierung mit APMA durch Substratumsatz von Peptid 1 (links) und Peptid 2 (rechts) fluorometrisch bestimmt. (Mz = Th-Zellen aus der Milz; Lk: Th-Zellen aus den Lymphknoten; -A: Th-Zellen aus der arthritischen Mäusen, -N: Th-Zellen aus normalen gesunden Mäusen). Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Die signifikanten Unterschiede zwischen Kokultur und Synoviozyten-Monokultur (SZ) wurden mit * gekennzeichnet, zwischen Kokultur mit Th-Zellen aus arthritischen und gesunden Mäusen mit +. (*, + $p \leq 0,05$; **, ++ $p \leq 0,01$)

Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, daß bereits ruhende naive Th-Zellen die SZ stimulierten, so daß es zu einem Anstieg von NO, IL-6 und MMP in den Kokulturüberständen kam. Allerdings führten Th-Zellen aus arthritischen Mäusen zu einer wesentlich stärkeren Stimulierung, ebenso wie Th-Zellen aus Mäusen mit einem akuten Entzündungsschub stärker stimulierten als Th-Zellen aus chronisch-arthritischen Mäusen. Die Stimulierung der Synoviozyten hängt daher wahrscheinlich von dem Aktivierungszustand der Th-Zellen ab. Besonders deutlich ist die höhere MMP-Aktivität in Kokulturüberständen von SZ mit Th-Zellen aus arthritischen Mäusen gegenüber Th-Zellen aus gesunden Mäusen. Dieser Unterschied in der MMP-Aktivität ist nicht nur durch eine stärkere Induktion der MMP-3 und -9 durch Th-Zellen aus arthritischen Tieren zu erklären, sondern auch durch die stärkere Stimulierung des Inhibitors TIMP-2 durch naive Th-Zellen. Daher kommt es bei Kokultur von Th-Zellen aus arthritischen Mäusen zu einer viel stärkeren Verschiebung des Gleichgewichtes von Enzym/Inhibitor. Nicht nur die stärkere TIMP-2-Induktion durch Th-Zellen aus gesunden Tieren, sondern auch die stärkere Inhibierung der PGE₂-Sekretion wirkte sich positiv auf die Synoviozyten-Aktivität aus. Zwischen Synoviozyten aus normalen oder arthritischen Mäusen waren keine signifikanten Unterschiede in ihrer Aktivierbarkeit nachweisbar.

3.4.2 Modulation der Zytokinsekretion der Th-Zellen durch Synoviozyten

Um die modulierende Wirkung von SZ auf unstimulierte Th-Zellen genauer zu untersuchen, wurden MNZ und separierte $CD4^+$ Th-Zellen aus Milzen und Lymphknoten arthritischer Mäuse direkt nach der Isolierung ohne weitere Stimulierung mit SZ kokultiviert und Th-Zytokine nach 48 h im Überstand gemessen.

Die Grundaktivität der isolierten $CD4^+$ Th-Zellen war sehr gering, was sich in einer niedrigen Sekretion aller gemessenen Zytokine äußerte. Bei Kokultur mit SZ kam es für IL-2 und $IFN-\gamma$ zu einem leichten, aber eindeutig nachweisbaren Anstieg, bei den $CD4^+$ Th-Zellen (Abb.26) stärker als bei den MNZ (nicht dargestellt). Die Th-Zellen aus den Lymphknoten sezernierten bei Kontakt mit SZ auch signifikant mehr IL-17. Der Anstieg dieser Zytokine könnte auf eine Stimulierung der Th-Zellen durch SZ zurückzuführen sein. Die Stimulierung ist jedoch relativ gering, was zunächst vermuten läßt, daß nur wenige einzelne Zellen, wie z.B. MHC II⁺ Zellen, die in der Kultur nur vereinzelt vorkommen, in der Lage sind, $CD4^+$ Th-Zellen zu stimulieren. Die Stimulierung des IL-2 trat jedoch in gleicher Weise bei Kontakt mit SZ aus gesunden wie aus arthritischen Tieren auf. Eine Aktivierung über Antigenstimulierung erscheint deshalb unwahrscheinlich. Die größeren Zytokinmengen könnten aber auch einfach nur auf eine verminderte Apoptose der Th-Zellen durch Kokultur zurückzuführen sein. Die Zytokine IL-4 und IL-10 lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

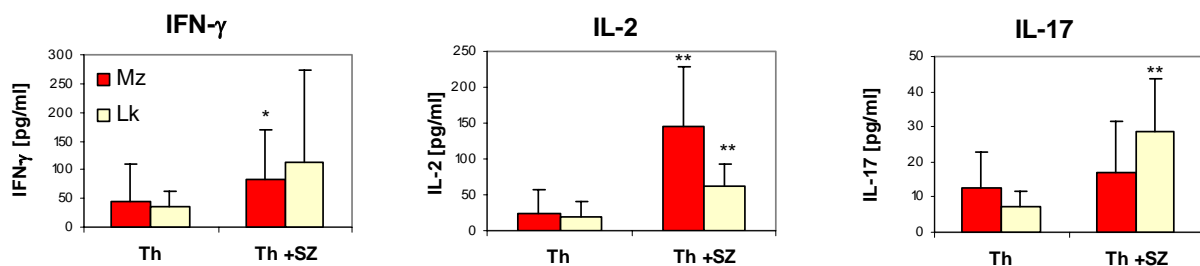


Abb. 26: Th-Zytokine in Kokulturüberständen

Th-Zell-Zytokine in Kulturüberständen von $CD4^+$ Th-Zellen (Th) aus Milzen (Mz) und Lymphknoten (Lk) arthritischer Mäuse im Vergleich zu Kokulturüberständen mit SZ (7d AIA) (Th+SZ). Bestimmung mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 (IL-2) bzw. 5 ($IFN-\gamma$ und IL-17) Versuchen mit den entsprechenden Standardabweichungen. Für die Berechnung der Signifikanzen wurden die jeweiligen Zytokinmengen der unstimulierten Th-Zellen der verschiedenen Versuche auf 100 % gesetzt und die entsprechenden Kokulturüberstände darauf bezogen in Prozent umgerechnet. Signifikante Unterschiede gegenüber den Th-Zell-Monokulturen (Lk und Mz separat) wurden mit * gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

3.5 Kokultur von Synoviozyten mit Th-Zellen von arthritischen TNF- α -defizienten Mäusen

Für die Interaktionen der T-Zellen mit SZ wird eine Beteiligung membranständigen TNF- α diskutiert (Dayer und Burger, 1999). Um zu überprüfen, welche Regulierungen über dieses Zytokin stattfinden, wurden SZ-Reaktionen auf Th-Zellen aus Wildtyp-Mäusen (WT) mit denen aus TNF- α -defizienten (KO) Mäusen verglichen. Dazu wurden die CD4⁺ Zellen mit magnetischen Beads aus Milzen und Lymphknoten von WT- und KO-Mäusen mit 7d AIA separiert und ohne weitere Stimulierung mit Synoviozyten aus WT-Mäusen mit 7d AIA kokultiviert.

Der Vergleich des Zytokinspektrums der Th-Zellen (ELISA und FACS) zeigte, daß die Th-Zellen aus den TNF- α -defizienten Mäusen wesentlich größere Mengen IFN- γ freisetzen (Ergebnisse nicht dargestellt). Auch IL-2 wird von den Zellen aus diesen Mäusen mehr gebildet. Diese verstärkte Th1-Aktivität ist auch in der Literatur beschrieben und als Ursache dieses Phänomens wird eine verminderte Apoptose der T-Zellen vermutet (Campbell et al., 2001). Das veränderte Zytokinspektrum kann ebenfalls zu einer Modulierung der Synoviozytenaktivität beitragen, so daß Veränderungen der SZ-Reaktionen in den Kokulturen nicht unbedingt allein auf TNF- α zurückgeführt werden können.

In der Kokultur mit den Th-Zellen aus den TNF- α -defizienten Tieren war die NO-Konzentration stark erhöht, was auf den erhöhten IFN- γ -Spiegel zurückgeführt werden kann (Abb.27). Außerdem waren die IL-2-, IL-6-, IL-17- und PGE₂-Spiegel leicht erhöht. Dies läßt vermuten, daß die Th-Zellen aus TNF- α -defizienten Mäusen eine starke allgemeine Aktivität aufweisen, welche auch die stärkere IL-6-Sekretion in SZ verursacht haben könnte. Auf die MMP-Produktion scheint die Aktivität der Th-Zellen jedoch keinen Einfluß genommen zu haben, denn in den Zymogrammen waren kaum Veränderungen im Vergleich zu Kokulturen mit Th-Zellen aus Wildtyp-Mäusen erkennbar (Ergebnisse nicht dargestellt). Der Fluoreszenzassay zeigte allerdings, daß die Th-Zellen aus den TNF- α -defizienten Mäusen zu einem etwas schwächeren Anstieg der MMP-Gesamtaktivitäten führten als die Th-Zellen aus den Wildtyp-Mäusen (Abb.28). Eine Aussage darüber, ob die Unterschiede signifikant sind, kann leider nicht getroffen werden, weil die Versuche nur zweimal durchgeführt wurden. Die Separation der SZ von den Th-Zellen durch Membraneinsätze führte nur in der Kokultur mit Th-Zellen aus Wildtyp-Mäusen zu einer deutlichen Verringerung der Aktivitäten (Abb.28 unten). Dies könnte darauf hinweisen, daß die geringere MMP-Induzierbarkeit durch Th-Zellen aus TNF- α -defizienten Tieren auf fehlendes membrangebundenes TNF- α zurückzuführen ist. Da die Aktivität nach Unterbindung des Zellkontaktes jedoch immer noch stärker war als in SZ-Monokulturen, müssen hier auch noch andere lösliche Faktoren an der Stimulierung beteiligt sein. Möglicherweise sind Mediatoren wie IL-17 an der Stimulierung beteiligt, die den Mangel an Stimulation durch fehlendes TNF- α wieder kompensieren.

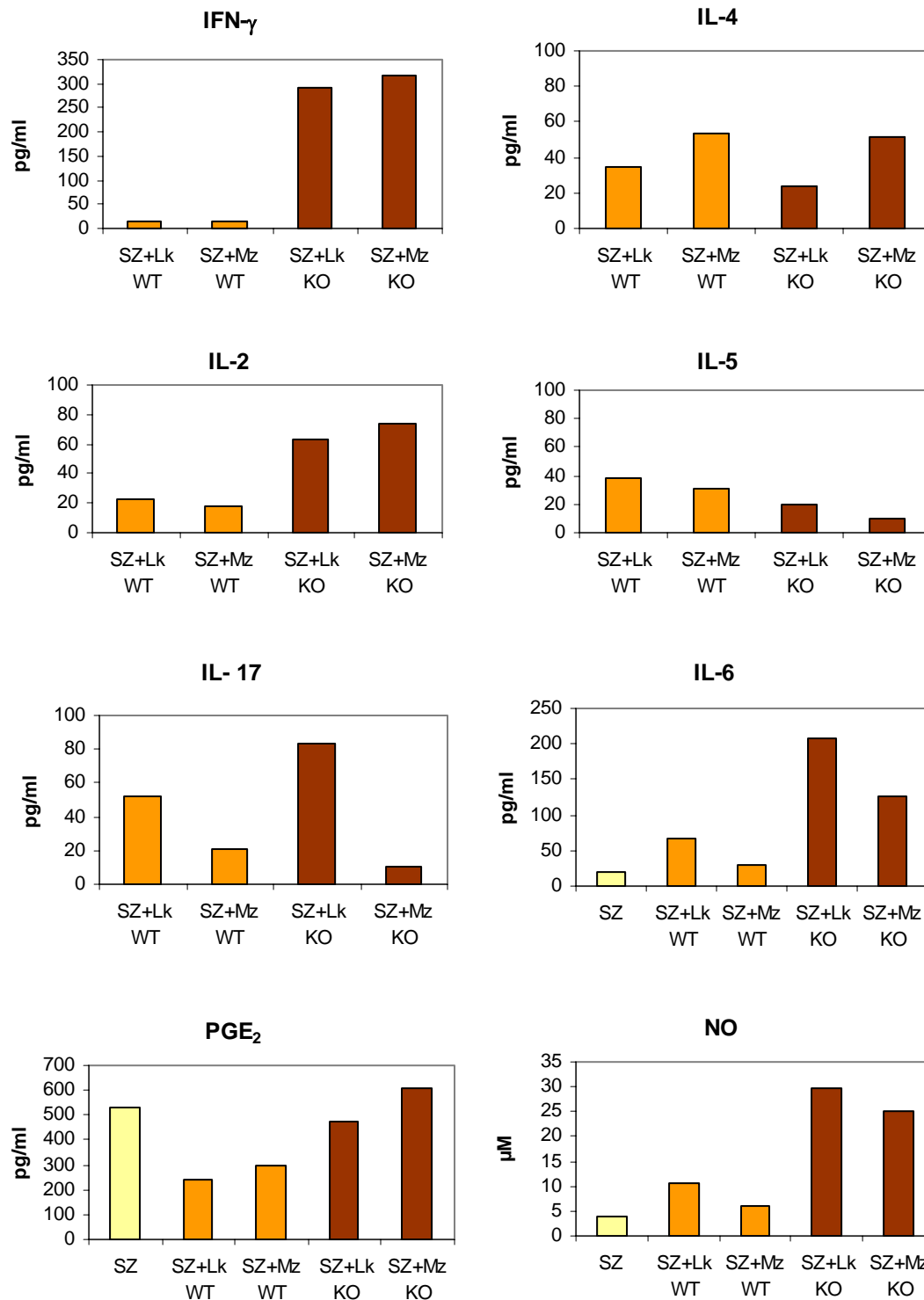


Abb. 27: Zytokine, PGE₂ und NO in Kokulturüberständen von SZ mit Th-Zellen aus TNF- α -defizienten Mäusen

SZ aus arthritischen Mäusen (7d AIA) wurden für 48 h mit Th-Zellen aus Milzen (Mz) und Lymphknoten (Lk) von arthritischen Wildtyp- (WT) oder TNF- α -defizienten (KO) Mäusen (7d AIA) kokultiviert. Im Kulturüberstand wurden die Zytokine und PGE₂ mittels ELISA und NO mit Griess-Reagenz bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 Experimenten.

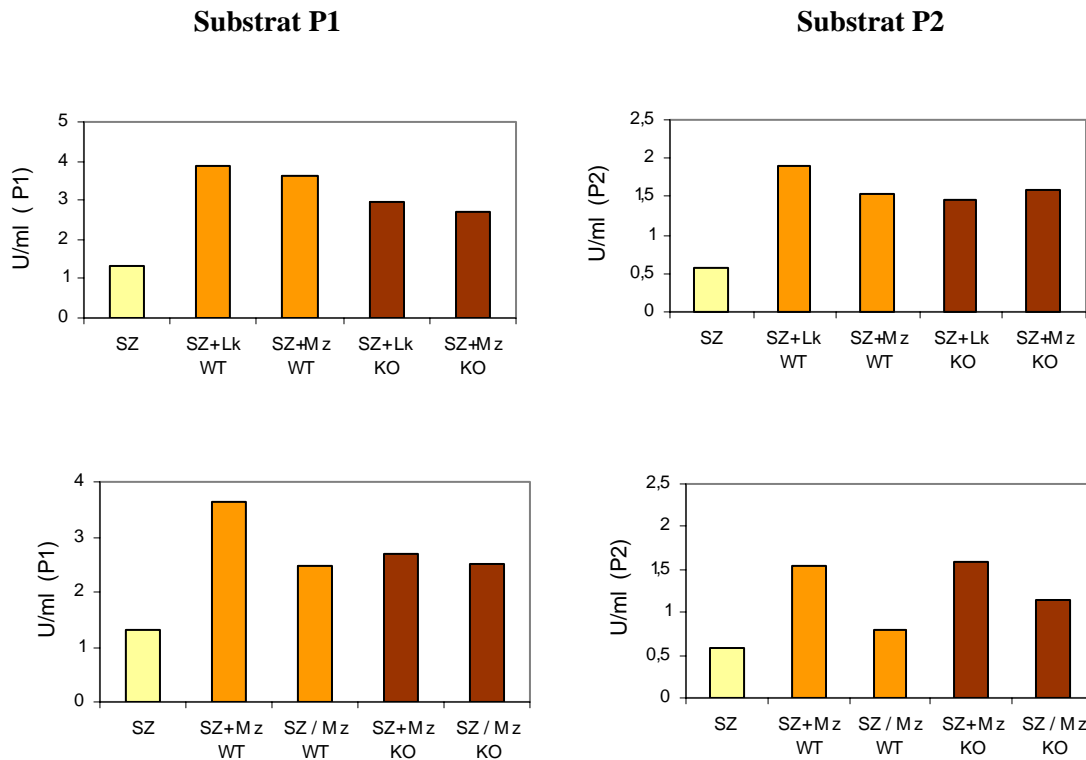


Abb. 28: MMP-Aktivität nach Kokultur von SZ mit Th-Zellen aus TNF- α -defizienten Mäusen

MMP-Aktivität in Kokulturüberständen von SZ (7d AIA) mit unstimulierten CD4⁺ Th-Zellen aus Milzen (Mz) oder Lymphknoten (Lk) von arthritischen Wildtyp (WT) oder TNF- α -defizienten (KO) Mäusen. Links: Umsatz von Peptid 1, rechts: Umsatz von Peptid 2, jeweils nach Aktivierung mit APMA. Untere Reihe: Verminderung der MMP-Induktion durch Membraneinsätze (SZ/Mz). Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 Experimenten.

Th-Zellen aus TNF- α -defizienten Mäusen führten zu einer deutlich stärkeren Induzierung der VCAM-1-Expression als Th-Zellen aus Wildtyp-Mäusen (Abb.29). Diese stärkere VCAM-1-Expression könnte auf die höheren IFN- γ -Mengen in den Kokulturen mit den TNF- α -defizienten Th-Zellen zurückzuführen sein (Abb.27). Als Kontrolle wurden die SZ mit rekombinantem IFN- γ stimuliert, was zu einer starken VCAM-1-Expression führte und die Zellproliferation senkte. Die schwächere Stimulierung der SZ durch Zellen aus der Milz im Vergleich zu denen aus Lymphknoten kann allerdings nicht auf das IFN- γ zurückgeführt werden, da die IFN- γ -Freisetzung von separierten Milzzellen sogar höher war (FACS und ELISA). Die Zellen aus den Milzen führten nur geringfügig zu einer gesteigerten Proliferation, während die Lymphknotenzellen stärker stimulierten, unabhängig davon, ob die Zellen aus den WT- oder KO-Mäusen stammten. Dies ist wahrscheinlich auch ein Grund für das höhere VCAM-1-Signal nach Kokultur mit Lymphknoten-Zellen im Vergleich zu Kokulturen mit Milzzellen.

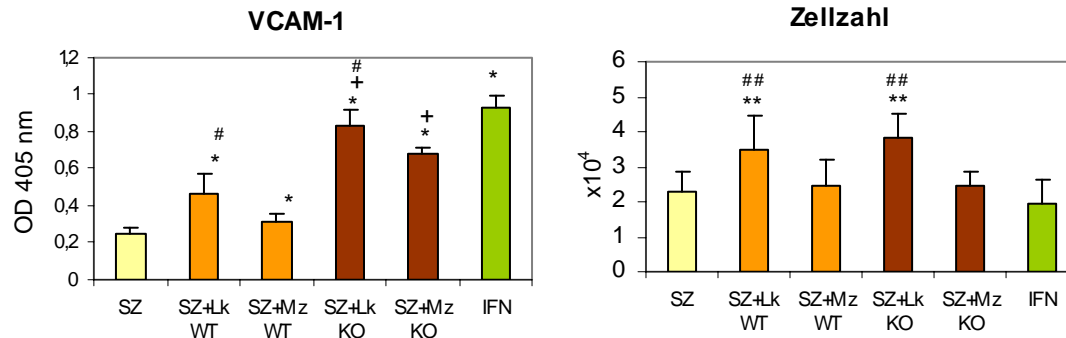


Abb. 29: VCAM-1-Expression und Zellzahl nach Kokultur mit T-Zellen aus WT und TNF- α -defizienten Mäusen

Nachweis des VCAM-1 auf der Zelloberfläche mittels Zell-ELISA und Bestimmung der Zellzahl über Kristallviolett-Färbung nach Kokultur von SZ mit unstimulierten Th-Zellen aus Milzen (Mz) oder Lymphknoten (Lk) von arthritischen Wildtyp (WT) oder TNF- α -defizienten (KO) Mäusen. Als Positiv-Kontrolle wurde eine Stimulierung mit 100 U/ml IFN- γ vorgenommen (rechte Säule). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Parallelansätzen eines Experimentes (repräsentatives Beispiel von 2 Experimenten). Die signifikanten Unterschiede zwischen Kokultur und Synoviozyten-Monokultur wurden mit *, zwischen Kokultur mit Th-Zellen aus Wildtyp-Mäusen (WT) und TNF- α -defizienten Mäusen (KO) mit + und zwischen Kokultur mit Th-Zellen aus Milzen (Mz) und Lymphknoten (Lk) mit # gekennzeichnet (*, +, # $p \leq 0,05$; **, ++, ## $p \leq 0,01$).

3.6. Kokultur von Synoviozyten mit Th-Subpopulationen

3.6.1 Kokultur von Synoviozyten mit *in vitro* generierten Th1- und Th2-Zellen

Aus der Literatur ist bekannt, daß bei der RA Th-Zellantworten vom Typ 1 überwiegen und vermutlich den Pathogenese prozeß forcieren, während Th2-Zellen eher eine gegenregulatorische Funktion haben (Miltburg et al., 1992; Berner et al., 2000; Park et al., 2001). Es sollte deshalb geprüft werden, welchen Einfluß die Th-Subpopulationen auf Synoviozyten haben.

Dazu wurden Th1- und Th2-Zellen *in vitro* aus naiven T-Zellen generiert und mit SZ kokultiviert. Naive CD4⁺ CD62L⁺ Zellen wurden hierfür aus Milzen und Lymphknoten normaler Mäuse isoliert, in einem definierten Zytokincocktail (siehe Material und Methoden S.22) für 2 Tage mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper stimuliert und dann 5 weitere Tage ohne Stimulanz in dem entsprechenden Zytokinmilieu kultiviert. Anschließend erfolgte der Ansatz der Kokultur mit SZ aus gesunden und arthritischen Gelenken. Der Einsatz von Transwellmembraneinsätzen, die direkten Zellkontakt der Zelltypen verhindern, aber Austausch löslicher Mediatoren ermöglichen, sollte weiterhin klären, welchen Einfluß die löslichen Faktoren im Vergleich zu membranständigen Faktoren haben.

Die *in vitro* generierten Th1-Zellen wiesen einen Anteil von 40 % - 60 % IFN- γ -produzierenden und ebenso viele TNF- α -produzierende Zellen auf, während IL-4-Produzenten in der durchflußzytometrischen Messung unter 1 % lagen (Abb. 30).

Die Zytokinspektren der Th2-Subpopulationen verschiedener Generierungsansätze waren hingegen in der IL-4- und IFN- γ -Produktion sehr unterschiedlich, wiesen aber immer viele TNF- α -produzierende Zellen auf (Abb.30). Häufig waren trotz IL-4-Produktion noch reichlich IFN- γ -Produzenten in den Th2-Subpopulationen nachweisbar. Im Vergleich zu den Th1-Zellen waren die sezernierten IFN- γ -Mengen, gemessen mittels ELISA, jedoch 50 bis über 1000-fach geringer. IL-4 wurde in Kulturüberständen von Th1-Subpopulationen in keinem Fall nachgewiesen, in den Th2-Kulturüberständen erreichten die Konzentrationen maximal 200 pg/ml.

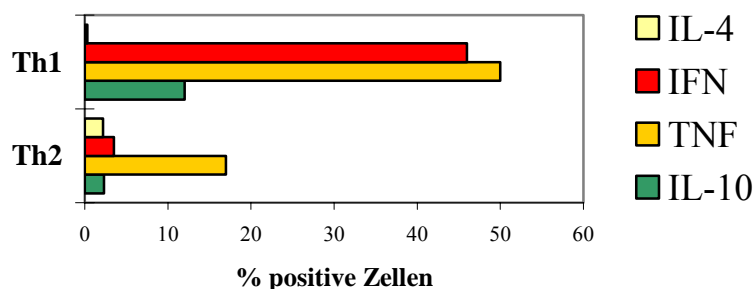


Abb. 30: Zytokinspektrum von *in vitro* generierten Th-Subpopulationen

FACS-Analyse der intrazellulären Zytokine IL-4, IFN- γ , TNF- α und IL-10 von *in vitro* generierten Th1- und Th2-Subpopulationen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 4 Experimenten.

Wie schon für die stimulierten T-Zellen aus arthritischen Tieren in Kapitel 3.2.2 gezeigt, wurden die *in vitro* generierten Th-Zellen, die für die Generierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper stimuliert worden waren, in ihrer Zytokinsekretion ebenfalls durch SZ gehemmt: Bei den Th1-Zellen ist eine signifikante Inhibierung von IFN- γ zu verzeichnen, bei den Th2-Zellen eine signifikante Inhibierung von IL-4 (Abb.31). Für die statistische Auswertung wurden die Zytokinmengen in prozentuale Anteile umgerechnet, da die absoluten Werte zwischen den Versuchen stark schwankten (nicht dargestellt). IL-2 wurde von den Th-Zellen nur geringfügig produziert und daher auch nur tendenziell, aber nicht signifikant in der Kokultur gehemmt. Beide Subpopulationen bildeten IL-10, welches ebenfalls durch Kontakt gehemmt wurde (Abb.31). Die IL-10-Expression schwankte sehr stark zwischen einzelnen Chargen generierter Th1-Subpopulationen. In 3 von 4 Ansätzen bildeten die Th1-Zellen mehr IL-10 als die Th2-Zellen, in einer Kultur war es jedoch umgekehrt. Die Inhibierung der Th-Zytokin-Sekretion wurde überwiegend durch SZ-konditioniertes Medium erreicht. Das bedeutet, daß die Hemmung größtenteils über lösliche Faktoren erfolgte. Der direkte Kontakt führte dennoch in allen Fällen nochmals zu einer weiteren Inhibierung der Th-Zellen. IL-17 und TNF- α waren in Th-Zellkultur- sowie in Kokulturüberständen nicht nachweisbar.

Die SZ wurden von beiden Th-Subpopulationen sehr effektiv stimuliert, wenn auch die Intensität der Stimulierung zwischen den verschiedenen Ansätzen stark variierte. SZ aus gesunden oder arthritischen Gelenken verhielten sich gleichartig, weshalb hier für die statistische Analyse alle Werte (3 x arthritische SZ, 2 x normale SZ) einbezogen wurden. Auch hier wurden die IL-6-Werte sowie die MMP-Aktivitäten für die statistische Analyse in prozentuale Anteile umgerechnet. Als Bezug dienten die Werte in den Kokulturüberständen von Th1-Zellen + SZ, da diese die geringsten Schwankungen aufwiesen.

In den meisten Kulturansätzen (4 von 5) stimulierten Th2-Zellen die IL-6-Produktion in SZ wesentlich stärker als Th1-Zellen (Abb.32a). Obwohl reine Th2-Zellkulturen ebenfalls IL-6 bildeten, ist es unwahrscheinlich, daß sie zu den großen IL-6-Mengen in den Kokulturüberständen wesentlich beigetragen haben. Denn wie aus Abb.29b erkennbar ist, werden Th2-Zellen in ihrer IL-6-Sekretion durch Kultivierung in Kulturüberständen von reinen SZ signifikant gehemmt, während SZ durch Kultivierung in Kulturüberständen von Th2-Zellen so stark stimuliert werden, daß sie ein vielfaches von dem bilden, was reine Th2-Kulturen sezernieren. In den meisten Fällen führte der direkte Zellkontakt zwischen Th-Zellen und SZ zu einer stärkeren Stimulierung als die Kultivierung mit Membraneinsätzen, was auf stimulierende Faktoren auf der Zellmembran von Th-Zellen hinweist. Die Unterschiede erreichten jedoch keine Signifikanz (Abb.32a). Weiterhin war zu beobachten, daß SZ, die in Th-Zellkulturüberständen kultiviert wurden, etwas stärker stimuliert wurden (nicht signifikant) als bei Kokultivierung mit Membraneinsätzen (Ergebnisse nicht dargestellt). Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß lösliche Mediatoren von Th-Zellen, die zu einer Stimulierung der IL-6-Sekretion in SZ führen, bei Kokultivierung von SZ mit Th-Zellen (mit Membraneinsätzen) ihrerseits durch Mediatoren von SZ gehemmt werden. Für IFN- γ und IL-10, die als Stimulatoren für IL-6 in

Betrachtet kommen, ist eine entsprechende Hemmung durch lösliche Faktoren von SZ nachgewiesen worden (Abb.31). Da IFN- γ nur von Th1-Zellen gebildet wird und IL-10 nur geringfügig zu einem IL-6-Anstieg führt (siehe Kap.3.1), tragen wahrscheinlich noch andere lösliche Faktoren, die überwiegend von Th2-Zellen gebildet werden, zur Induktion des IL-6 in SZ bei. Auch eine synergistische Wirkung mehrerer Faktoren ist dabei denkbar.

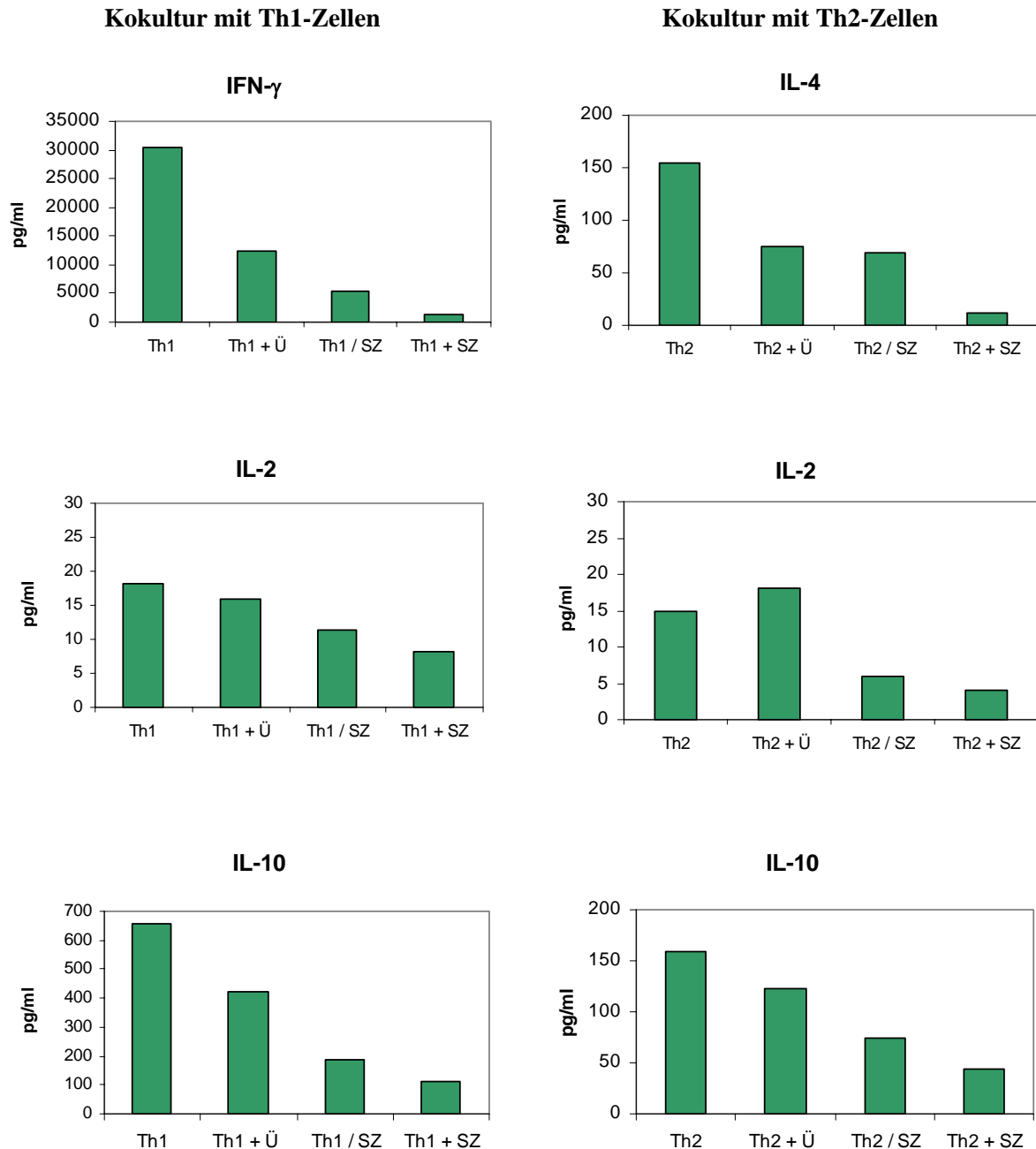


Abb. 31: Th-Zytokine in Kokulturüberständen von SZ mit *in vitro* generierten Th1- und Th2-Zellen

Inhibierung der Zytokinfreisetzung in Th-Zellen (Th1: linke Reihe, Th2: rechte Reihe) durch Kontakt mit SZ, linke Säule: Zytokine in reinen Th-Zellkulturüberständen (Th1 bzw. Th2), 2. Säule: Th-Zellen in Kulturüberständen von SZ (Ü) kultiviert, 3. Säulen: Th-Zellen und SZ kokultiviert mit Unterbindung des direkten Zellkontaktes durch Membraneinsätze (Th/SZ), 4. Säule: Th-Zellen und SZ in direktem Kontakt kokultiviert. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 4 Versuchen.

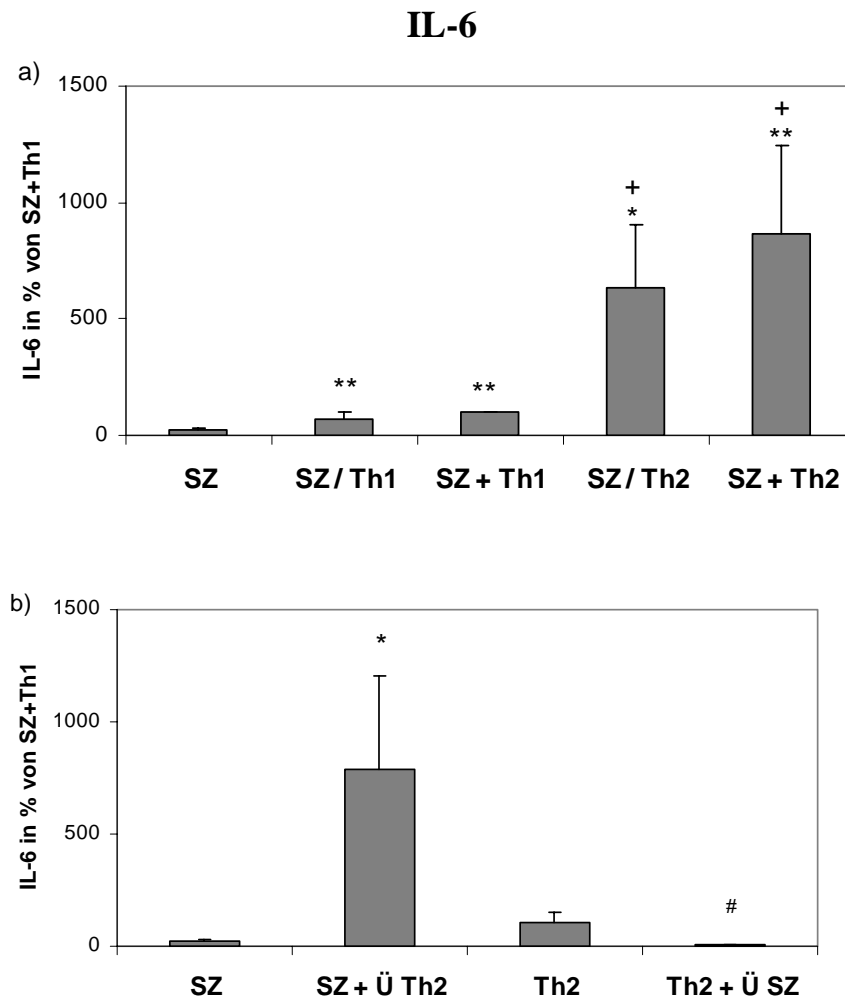


Abb. 32: IL-6 in Kokulturüberständen von SZ mit *in vitro* generierten Th-Zellen

SZ (aus arthritischen, 7d AIA und normalen Mäusen) wurden 48 h mit *in vitro* generierten Th-Subpopulationen aus naiven Th-Zellen kokultiviert. In den Kulturüberständen wurde IL-6 mittels ELISA bestimmt. Da die Basiswerte zwischen einzelnen Experimenten stark schwankte, sind alle Meßwerte prozentual auf die IL-6-Werte in den Überständen von SZ+Th1-Zellen bezogen. Dargestellt sind: a) reine SZ-Zellkulturüberstände (SZ), SZ kokultiviert mit Th-Zellen bei Unterbindung des direkten Zellkontaktes durch Membraneinsätze (SZ/Th), SZ in direkten Kontakt mit Th-Zellen (SZ+Th); b) SZ kultiviert in Kulturüberständen von Th2-Zellen (SZ + Ü Th2), reine Th2-Zellkulturüberstände (Th2) und Th2-Zellen kultiviert in Kulturüberständen von SZ (Th2 + Ü SZ). Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte \pm SEM von 5 Versuchen dar. Signifikante Unterschiede wurden wie folgt gekennzeichnet: zu reinen Synoviozytenkulturen (SZ) mit *, zwischen Kokulturen mit Th1 und Th2-Zellen (d.h. zwischen SZ+Th1 und SZ+Th2 bzw. zwischen SZ/Th1 und SZ/Th2) mit +, zwischen Th2 und Th2 + Ü SZ mit # (*, +, # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den direkt und indirekt kultivierten Kokulturen auf.

Die NO-Sekretion von SZ wurde sowohl durch Kultur mit Th1- als auch mit Th2-Zellen signifikant erhöht. Dabei wirkten Th1-Zellen signifikant stärker (Abb.33). Die Unterbindung des direkten Zellkontaktes durch Membraneinsätze verringerte die NO-Sekretion geringfügig, welches jedoch keine Signifikanz erreichte. IFN- γ dürfte hierbei einer der wesentlichen Faktoren sein, der zur Induktion des NO führte.

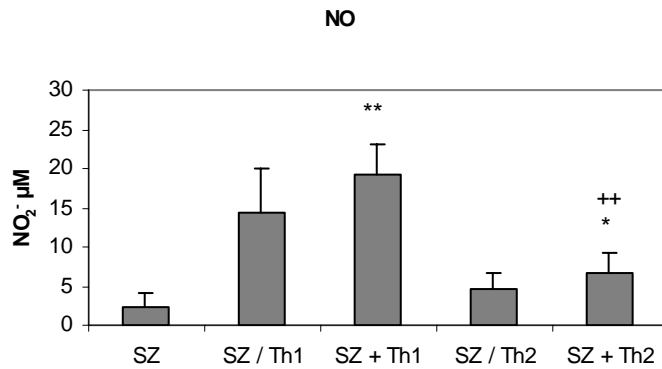


Abb.33: NO in Kokulturüberständen von SZ mit *in vitro* generierten Th-Zellen

NO in Kokulturüberständen von SZ mit Th-Zellen, bestimmt mit Griess-Reagenz. Kokultur mit direktem Zellkontakt: SZ+Th1 bzw. SZ+Th2, Kokultur mit Unterbindung des direkten Zellkontaktes: SZ/Th1 bzw. SZ/Th2. Dargestellt sind die Mittelwerte von 4 Versuchen \pm SEM. Signifikante Unterschiede zu reinen SZ-Kulturen sind mit * und zwischen den Kokulturen SZ+Th1 und SZ+Th2-Zellen mit + gekennzeichnet (*, + $p < 0,05$; **, ++ $p < 0,01$). Eine signifikante NO-Steigerung wurde nur durch direkten Zellkontakt erreicht.

Obwohl die MMP-Gesamtaktivitäten in verschiedenen Versuchsansätzen sich stark unterschieden, und in einem Experiment sogar die Th1-Zellen stärker stimulierten, führten dennoch insgesamt die Th2-Zellen zu einer signifikant stärkeren MMP-Aktivität als die Th1-Zellen (Abb.34). Eine klare Korrelation zwischen den gemessenen Zytokinen und den MMP-Aktivitäten war nicht zu erkennen. Im Gegensatz zur IL-6-Induktion ist der direkte Kontakt für die MMP-Induktion durch Th1-Zellen essentiell, denn bei Trennung der Th1-Zellen von den SZ durch Membraneinsätze bewirkten diese keinerlei MMP-Anstieg (Abb.34).

Die Zymogramme spiegeln die in den Fluoreszenzssays gemessenen Aktivitäten wider. Auch hier waren meistens die Th2-Zellen stärkere MMP-9- und MMP-3-Induktoren (Ergebnisse nicht dargestellt).

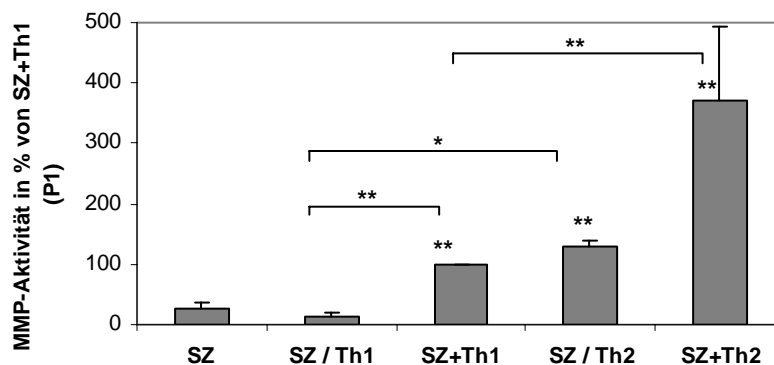


Abb. 34: MMP-Gesamtaktivität in Kokulturüberständen von SZ mit *in vitro* generierten Th-Zellen

MMP-Gesamt-Aktivität in Kokulturüberständen von SZ mit *in vitro* generierten Th-Zellen nach 48 h. Substratumsatz von Peptid 1 nach Aktivierung mit APMA, Fluoreszenzassay. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 5 Versuchen, prozentual bezogen auf die Aktivität in Kulturüberständen von SZ mit Th1-Zellen (SZ+Th1). SZ: reine Synoviozytenüberstände; SZ/Th: Kokultur mit Membraneinsätzen zur Unterbindung des direkten Zellkontaktes, SZ+Th: Kokultur mit direktem Zellkontakt. Signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen sind mit * gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Bemerkenswert ist, daß die TIMP-2-Induktion durch Th1-Zellen im wesentlichen durch direkten Zellkontakt induziert wird, während Th2-Zellen sowohl bei direktem Kontakt als auch allein schon durch freigesetzte Mediatoren die TIMP-2-Produktion erheblich verstärken (Reverse Zymogramme, nicht dargestellt). Durch Unterbindung des Zell-Kontaktes kam es bei Kokultur mit Th2-Zellen kaum zu einer Senkung des TIMP-2, in einer Kultur deutet sich sogar eine Steigerung der TIMP-2-Produktion an. Welche Th-Subpopulation zu einer stärkeren TIMP-2 Induktion führte, ist aus den Versuchen nicht eindeutig belegbar: In 2 von 4 Ansätzen führten die Th2-Zellen zu einer verstärkten TIMP-2-Produktion, in den anderen beiden war die TIMP-2 Sekretion gleich hoch wie nach Kokultur mit Th1-Zellen (Ergebnisse nicht dargestellt). TIMP-1 ließ sich von Th1- und Th2-Zellen in nur 2 von 4 Experimenten schwach induzieren. Bei Trennung der Zellen nahm die TIMP-1-Menge wieder geringfügig ab, sowohl bei Kokultur mit Th1- als auch mit Th2-Zellen.

Zusammenfassung

Die *in vitro* generierten Th1- und Th2-Subpopulationen unterschieden sich deutlich in ihrem Zytokinspektrum, die Th1-Zellen bildeten viel IFN- γ und TNF- α , während die Th2-Zellen TNF- α und mäßige IL-4-Mengen produzierten. Die Zytokinsekretion beider Subpopulationen wurde durch Kokultur mit Synoviozyten gehemmt. An der Inhibierung sind im wesentlichen wieder lösliche Mediatoren beteiligt.

Beide Th-Subpopulationen führten zu einer deutlichen Stimulierung der Synoviozyten. Trotz starker Unterschiede in der Intensität der Stimulierung zwischen verschiedenen Experimenten war dennoch die klare Tendenz zu erkennen, daß Th2-Zellen die Bildung von IL-6, MMP und TIMP-2 wesentlich stärker stimulierten als Th1-Zellen. Das Gleichgewicht zwischen MMP und TIMP wurde ebenfalls durch Th2-Zellen stärker verschoben, was sich in einer stärkeren MMP-Gesamtaktivität im Fluoreszenzassay äußerte. NO wurde indessen in allen Fällen stärker durch Th1-Zellen induziert. Der direkte Kontakt zwischen Th-Zellen und SZ stimulierte effektiver als reiner Medienaustausch, auch wenn die Unterschiede nicht immer eine Signifikanz erreichten. Eine sehr deutliche Zell-Kontaktabhängigkeit zeigte sich aber bei der Induktion der MMP-Aktivität, für Th1-Zellen noch wesentlich ausgeprägter als für Th2-Zellen. Die Induktion des TIMP-2 durch Th2-Zellen war hingegen zellkontaktunabhängig, die durch Th1-Zellen zellkontaktabhängig.

3.6.2 Kokultur von Synoviozyten mit *ex vivo* separierten IFN- γ^+ und IFN- γ^- Th-Zellen

Die *in vitro* generierten Th-Subpopulationen zeigten, daß die Th2-Zellen in der Lage waren, die SZ stärker zu aktivieren als die Th1-Zellen. Dies steht im Widerspruch zu der Hypothese, daß die Th1-Zellen stärker zur Pathogenese beitragen. Da die *in vitro* generierten Th-Zellen aus naiven Th-Zellen gewonnen wurden und daher keine Spezifität gegenüber dem AIA auslösenden Antigen (mBSA) aufwiesen, kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich antigenspezifische Th1- und Th2-Zellen aus arthritischen Mäusen anders verhalten. Durch die Immunisierung mit Mykobakterien wird insbesondere die Polarisierung von Th1-Zellen induziert. Daher ist in immunisierten Tieren ein höherer Anteil von Antigen-spezifischen Th1-Zellen als Th2-Zellen zu erwarten. Sollte die Aktivierung der SZ von der Antigenspezifität der Th-Zellen abhängen, so sollten *ex vivo* separierte Th1- und Th2-Zellen aus immunisierten Tieren im Vergleich zu den *in vitro* generierten Th-Zellen andere Eigenschaften aufweisen. Aus diesem Grund wurden aus immunisierten Mäusen CD4⁺ Zellen aus Lymphknoten und Milzen separiert und anhand des Zytokins auf der Zelloberfläche in eine IFN- γ^+ und IFN- γ^- Fraktion getrennt.

In zwei Experimenten konnte eine deutliche Trennung in zwei unterschiedliche Subpopulationen erreicht werden. Die Populationen unterschieden sich insbesondere in der IFN- γ - und IL-4-Sekretion, nachgewiesen mittels ELISA im Kulturüberstand und mit Hilfe der intrazellulären Zytokinfärbung im FACS (Abb.35). In der IFN- γ^+ Population war die IFN- γ -Produktion deutlich höher als in der IFN- γ^- Population, jedoch war auch letztere nicht völlig frei von IFN- γ -bildenden Th-Zellen. Die nachgewiesenen IL-4-Mengen in der IFN- γ^- Population zeigten jedoch, daß in dieser Population Th2-Zellen ausreichend angereichert wurden, während diese in der IFN- γ^+ Population nicht nachgewiesen werden konnten. Im FACS wurden vergleichsweise hohe Mengen von TNF- α nachgewiesen. Die Anzahl TNF- α^+ Zellen war fast genauso hoch wie die der IFN- γ^+ Zellen.

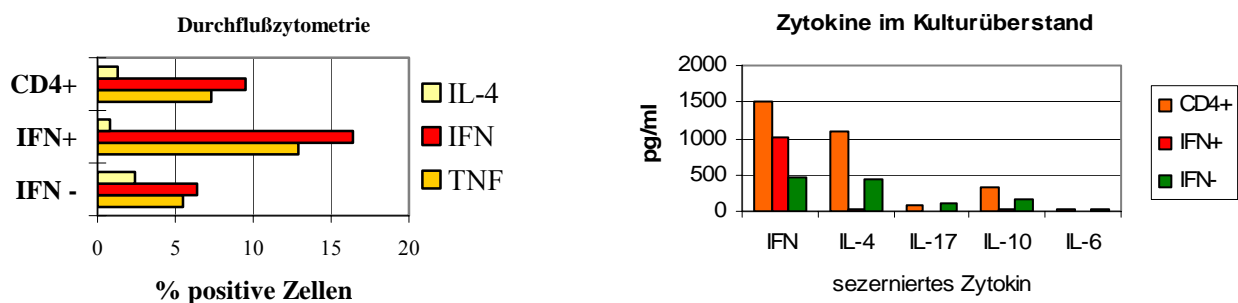


Abb. 35: Zytokin-Expression in isolierten Th-Zellen

Die aus immunisierten Tieren gewonnenen CD4⁺ Th-Zellen (CD4⁺) wurden anhand des auf der Zelloberfläche befindlichen IFN- γ in die zwei Subpopulationen IFN- γ^+ (IFN+) und IFN- γ^- (IFN-) Th-Zellen separiert und deren Zytokinmuster parallel zum Kokulturansatz in der Durchflußzytometrie (links) und mittels ELISA im Kulturüberstand (rechts) ermittelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 Experimenten.

In der IFN- γ Population wurden auch IL-17-produzierende Zellen nachgewiesen. Dieses Zytokin wird den Gedächtniszellen zugeschrieben. Eine Doppelfärbung der CD4⁺ Th-Zellen mit IL-17 und CD45RB in der Durchflußzytometrie bestätigte dies: Die Expression des IL-17 war in CD45RB^{low} Memory-Zellen zu finden (Abb.36). Doppelfärbungen mit anti-IFN- γ -FITC und anti-IL-17-PE zeigten dagegen, daß keine Koexpression beider Zytokine vorkam, d.h. IL-17 wurde nicht von IFN- γ -bildenden Th1-Zellen gebildet, wie es für humane Zellen beschrieben worden ist. Im Kulturüberstand der IFN- γ Population war mehr IL-17, IL-10 und IL-6 nachweisbar als in Überständen von IFN- γ ⁺ Th-Zellen.

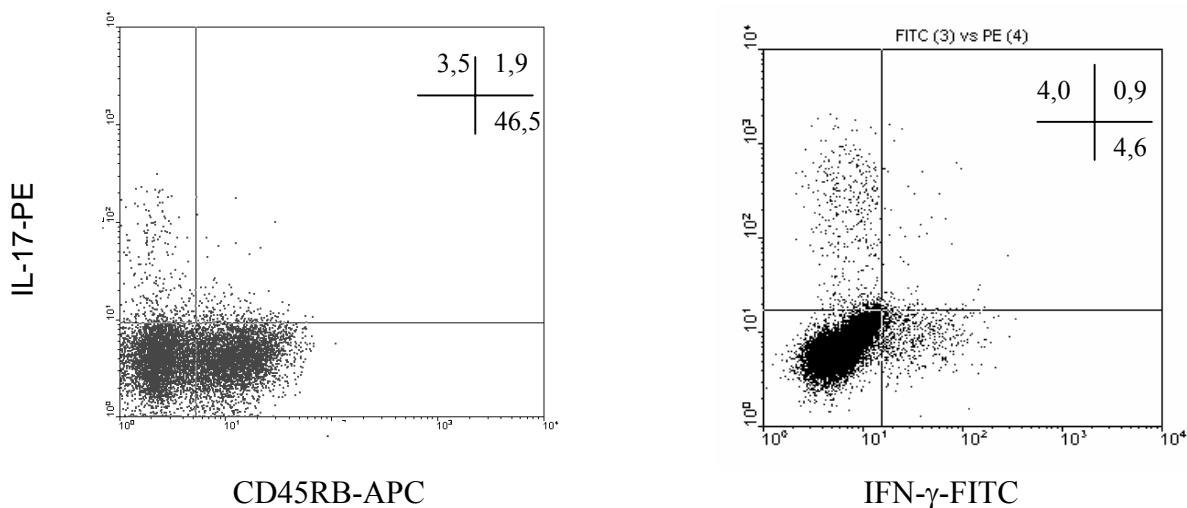


Abb. 36: FACS-Analyse von IL-17-produzierenden Th-Zellen

CD4⁺ Th-Zellen, separiert aus Milzen arthritischer Mäuse (7d AIA) wurden für 5 h mit PMA+Ionomycin stimuliert, fixiert und mit anti-IL17-PE und anti-CD45RB-APC (links) bzw. mit IL-17-PE und anti-IFN- γ -FITC (rechts) doppelgefärbt. IL-17 wurde hauptsächlich von CD45RB^{low} Th-Zellen gebildet, eine Koexpression mit IFN- γ wurde nicht gefunden.

In den Kokulturen der SZ mit den Th-Subpopulationen führte die IFN- γ ⁺ Population zu einer wesentlich stärkeren NO-Stimulation, während die IFN- γ Population eine höhere IL-6-Sekretion bewirkte (Abb.37). Die höheren IL-4-, IL-17- und IL-10-Spiegel der IFN- γ Zellen waren trotz Inhibierung durch die SZ auch noch in der Kokultur deutlich. Bei Separation der SZ von den Th-Zellen durch Membraneinsätze waren alle gemessenen Zytokine sowie NO erheblich niedriger, d.h. die Stimulierung der SZ zur IL-6- und NO-Sekretion erfolgt im wesentlichen über membranständige Faktoren, während die Inhibierung der Th-Zytokine eher über lösliche Faktoren stattfindet. Bei direktem Kontakt ist die Inhibierung von IL-4, IL-17 und IL-10 sogar geringer als bei Unterbindung des Zell-Zell-Kontaktes (Abb.37). PGE₂ wurde geringfügig stärker durch IFN- γ Zellen stimuliert, während TNF- α in den Kokulturen in nur geringen Mengen (20-40 pg/ml) sezerniert wurde und keiner Subpopulation stärker zugeordnet werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt). Parallele Ansätze von SZ aus normalen Mäusen führten zu sehr ähnlichen Ergebnissen wie die Kokulturen von SZ aus arthritischen Gelenken (Ergebnisse nicht dargestellt).

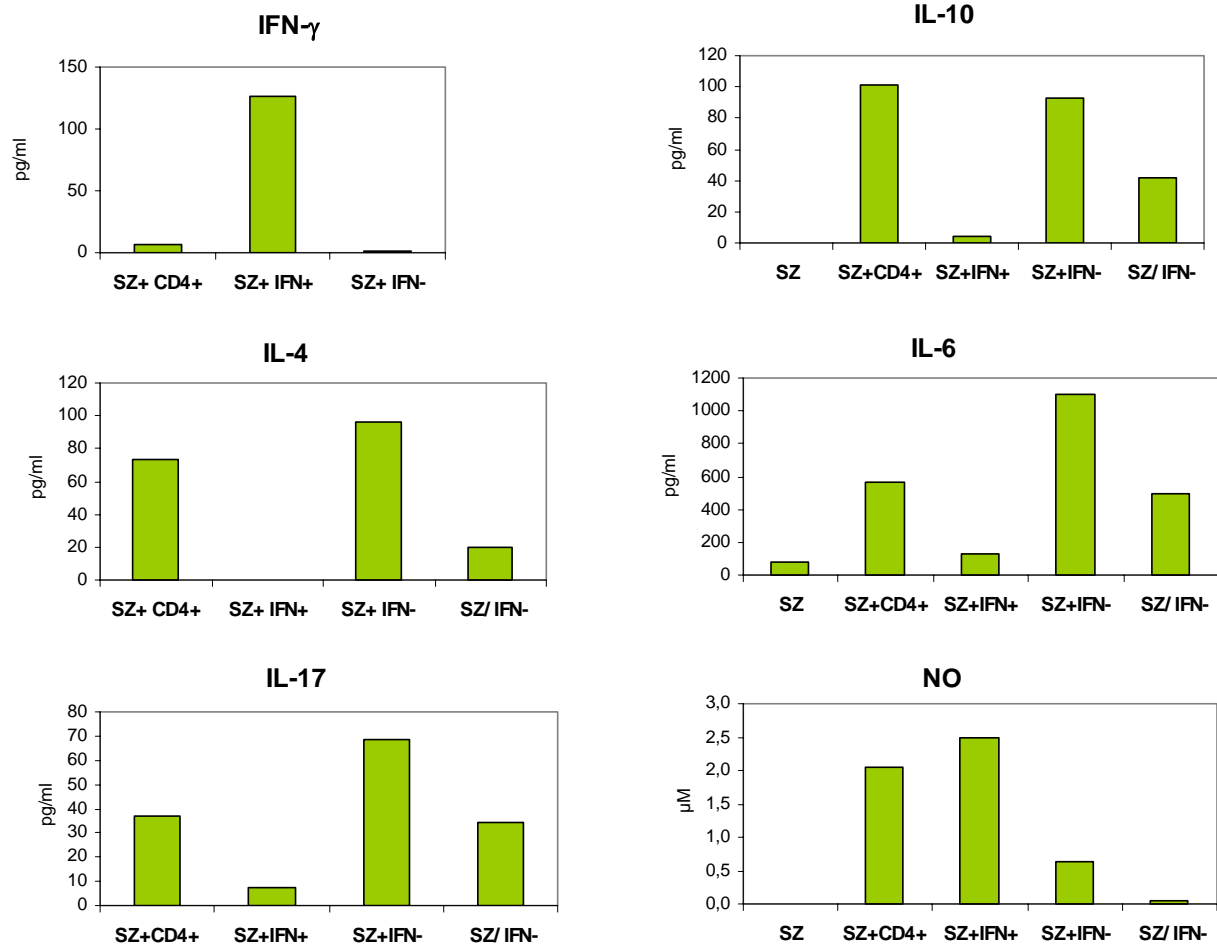


Abb. 37: Zytokine in Kokulturüberständen von SZ und Th-Subpopulationen aus immunisierten Tieren

Th-Subpopulationen, separiert nach IFN- γ^+ (IFN+) und IFN- γ^- (IFN-) Th-Zellen sowie unseparierte CD4 $^+$ Th-Zellen (CD4+) wurden 48 h mit SZ (7d AIA) kokultiviert und die Zytokine mittels ELISA bestimmt, NO mit Griess- Reagenz. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 Experimenten.

Die VCAM-1-Expression war sowohl nach Kultur mit der IFN- γ^+ als auch mit der IFN- γ^- Subpopulation verstärkt, ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kokulturanätzen trat jedoch nicht auf (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Zymogramme zeigten eine starke Induktion von MMP-9 und MMP-3 durch IFN- γ^- Zellen und nur eine schwache Induktion durch IFN- γ^+ Zellen. Jedoch wurde auch TIMP-2 von den IFN- γ^- Zellen stärker stimuliert (Tab.14). Der Aktivitätsnachweis im Fluoreszenzassay zeigte, daß dennoch die IFN- γ^- Zellen zu einem höheren Anstieg der MMP-Gesamtaktivität führten als die IFN- γ^+ Zellen (Abb.38). Die Trennung der IFN- γ^- Zellen von den SZ durch eine Membran führte zwar zu einer verminderten MMP-9- und MMP-3-Induktion, konnte die TIMP-2-Stimulierung jedoch nicht herabsetzen - im Gegenteil, es deutete sich hier sogar noch eine leichte Steigerung der TIMP-2-Produktion an. Aus diesem Grund war die MMP-Gesamtaktivität im Fluoreszenzassay auch deutlich niedriger als in der Kokultur mit direktem Zellkontakt.

Tab. 14: MMP und TIMP in Kokulturüberständen von SZ mit *ex vivo* separierten Th-Subpopulationen

	SZ	SZ + CD4 ⁺ unsep.	SZ + CD4 ⁺ IFN- γ ⁺	SZ + CD4 ⁺ IFN- γ ⁻	SZ /Membran/ CD4 ⁺ IFN- γ ⁻
MMP-9	-	++	+	+++	+
MMP-3	-	++	+	+++	+
TIMP-1	-	+	+	++	+
TIMP-2	+	++	+++	++++	++++

Stärke der MMP-Banden im Gelatine- (MMP-9) und Casein- (MMP-3) Zymogramm sowie der TIMP-Banden im reversen Zymogramm (- keine Bande, + schwache Bande, ++ gut sichtbare Bande, +++ starke Bande, ++++ sehr starke Bande).

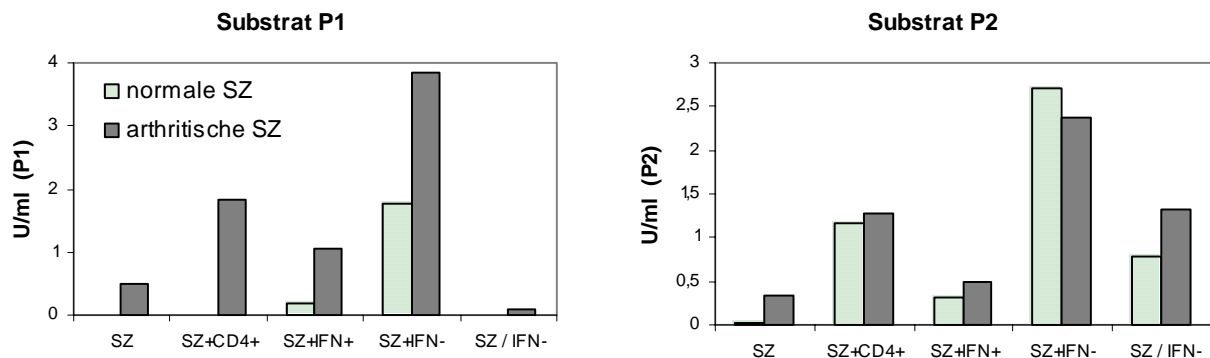


Abb. 38: MMP-Aktivität nach Kokultur von normalen und arthritischen SZ mit Th-Subpopulationen

Th-Zellen (CD4⁺) wurden aus immunisierten Mäusen nach Stimulierung anhand des membrangebundenen IFN- γ in Subpopulationen getrennt (IFN⁺ und IFN⁻) und nach 4 Tagen mit SZ aus normalen oder arthritischen Gelenken 48 h kokultiviert. Substratumsatz von Peptid 1 (links) und Peptid 2 (rechts) in Kokulturüberständen nach Aktivierung mit APMA, Fluoreszenzassay. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 Experimenten.

Da IL-17, welches in der Kokultur in hohen Mengen nachgewiesen wurde, in SZ besonders stark die MMP- und IL-6-Sekretion stimulieren kann (siehe Kap. 3.1), könnte dieses Zytokin maßgeblich zur Stimulierung der SZ beigetragen haben. Der direkte Zellkontakt hatte jedoch noch einen wesentlich stärkeren Einfluß auf die SZ, so daß hier membrangebundene Faktoren wahrscheinlich einen größeren Einfluß ausüben oder mit IL-17 synergistisch wirken.

Diese Experimente zeigen, daß die IFN- γ Population, die Gedächtniszellen und Th2-Zellen oder eine noch nicht näher definierte Th-Subpopulation enthält, SZ stärker stimuliert als IFN- γ ⁺ Th-Zellen.

3.6.3 Zusammenfassung

Die *in vitro* generierten Th1- und Th2-Zellen wiesen ein ähnliches Zytokinprofil auf wie die *ex vivo* separierten IFN- γ^+ und IFN- γ^- Th-Zellen aus immunisierten Mäusen. Sowohl unter den Th2-Zellen als auch unter den IFN- γ^- Th-Zellen waren wenige IL-4-produzierende und viele TNF- α -produzierende Zellen. IL-17 war nur in IFN- γ^- Zellen nachweisbar. Unter den Th1-Zellen und den IFN- γ^+ Zellen waren reichlich IFN- γ - und TNF- α -Produzenten.

Die Synoviozyten reagierten mit Zytokin- und MMP-Sekretion überwiegend stärker auf die Th2-Zellen wie auch auf die IFN- γ^- Zellen, nur die NO-Sekretion wurde durch Th1- bzw. IFN- γ^+ Zellen stärker induziert (Tab.15). Für die Induktion der MMP-Sekretion war ein direkter Kontakt mit den Th-Zellen notwendig, während für die TIMP-2-Induktion nur bei den Th1-Zellen ein direkter Kontakt noch zu einer deutlichen Steigerung der Sekretion führte. IL-6 und NO konnten durch lösliche Faktoren induziert und durch direkten Zellkontakt meist noch verstärkt werden.

Tab. 15: Modulation der SZ-Reaktivität durch Th-Subpopulationen

	NO	IL-6	MMP-Aktivität (Fluoreszenzassay)	TIMP-2
Th1	↑↑	↑(↑)	↑	↑
Th2	↑	↑↑	↑↑	↑(↑)
IFN-γ^+	↑↑	↑	↑	↑
IFN-γ^-	↑	↑↑↑	↑↑	↑↑

- keine Veränderung
- (↑) nur in einigen Experimenten stärker
- ↑ deutliche Steigerung
- ↑↑ sehr starke Steigerung
- ↑↑↑ extrem starke Steigerung

3.7 Modulation der Kokulturen durch Zytokine oder TGF- β

Die in Kapitel 3.6 beschriebenen Versuche verdeutlichen, daß allein eine Verschiebung der Th-Subpopulationen von Th1-Zellen zu Th2-Zellen die Synoviozyten-Aktivität nicht mindern kann. Da die Aktivierung der SZ überwiegend durch membranständige Moleküle auf Th-Zellen realisiert wurde und die Th-Zellen selbst nur geringe Zytokinmengen sezernieren, sollte als nächstes untersucht werden, ob durch Zusatz von löslichen Mediatoren die zellulären Wechselwirkungen moduliert werden können. Dafür wurden SZ (7d AIA) mit CD4⁺ Th-Zellen (4 Tage vor Kokultur mit PMA und Ionomycin stimuliert) aus arthritischen Mäusen kokultiviert und die Zytokine IFN- γ , IL-4 oder TGF- β 1 zugesetzt. Die Modulation mit TGF- β 1 wurde auch an TNF- α -stimulierten SZ bzw. Kokulturen untersucht. Nach 48 h wurde die Menge sezernierter Zytokine, PGE₂ und NO im Überstand gemessen.

3.7.1 Modulation von unstimulierten und TNF- α -stimulierten Kulturen mit TGF- β 1

Bei der RA ist der Wachstumsfaktor TGF- β 1 in der Synovialflüssigkeit in besonders hohen Konzentrationen zu finden. Wegen seiner antiinflammatorischen Eigenschaften sollte untersucht werden, ob dieser Wachstumsfaktor bei der Interaktion der Th-Zellen mit SZ gegenregulatorische Funktionen ausübt. Da in der RA ferner auch TNF- α als proinflammatorisches Zytokin überexprimiert ist, wurden einige Versuche auch unter Einsatz von externem TNF- α durchgeführt, um die SZ zu stimulieren. Als Kontrollen hierzu dienten Ansätze nur mit TNF- α .

Auf Th-Zellen zeigten TNF- α und TGF- β 1 gegensätzliche Effekte, während sie auf SZ meistens synergistisch oder additiv-stimulatorisch wirkten.

TGF- β 1 hatte auf die reine Th-Zellkultur insgesamt einen hemmenden Einfluß, es senkte nicht nur die IFN- γ -Sekretion, sondern auch die von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-17 (Abb.39). Die Ursache hierfür könnte in einer Suppression der T-Zell-Proliferation liegen, die für TGF- β auch schon von Brabletz et al. (1993) beschrieben wurde. TNF- α erzeugte in Th-Zellen einen deutlichen Anstieg von IFN- γ . IL-17 und IL-10 wurden durch TNF- α allenfalls geringfügig gesteigert, während alle anderen Th-Zytokine nicht beeinflußt wurden. Der inhibierende Effekt von TGF- β 1 auf IFN- γ , IL-4 und IL-5 konnte von TNF- α nicht aufgehoben werden.

In der Kokultur wirkte sich die Inhibierung der Th-Zytokine durch TGF- β 1 wesentlich geringer aus, entweder weil die Zytokinsekretion durch den Kontakt der Th-Zellen mit SZ sowieso schon stark gehemmt wurde oder weil hier durch die SZ eine Gegenregulation erfolgte. IL-17 wurde durch TGF- β 1 auch in der Kokultur noch effektiv gehemmt, bei Anwesenheit von TNF- α wirkte sich der inhibierende Effekt dagegen nur noch geringfügig aus. Es ist hierbei aber zu bedenken, daß die absoluten IL-17-Mengen in diesen Versuchen sehr niedrig waren. Die IL-10-Sekretion von Th-Zellen als auch von SZ wurde durch TGF- β 1 kaum beeinflußt. In 2 von 3 Versuchen deutete sich eine Hemmung der IL-10-Sekretion in Th-Zellen und eine Stimulation in SZ durch TGF- β 1 an. Die

konträren Reaktionen der Zelltypen glichen sich daher in der Kokultur nahezu aus, so daß sich hier keine eindeutigen Veränderungen in der IL-10-Sekretion durch TGF- β 1 nachweisen ließen. IL-2 war in allen Fällen unter der Nachweisgrenze.

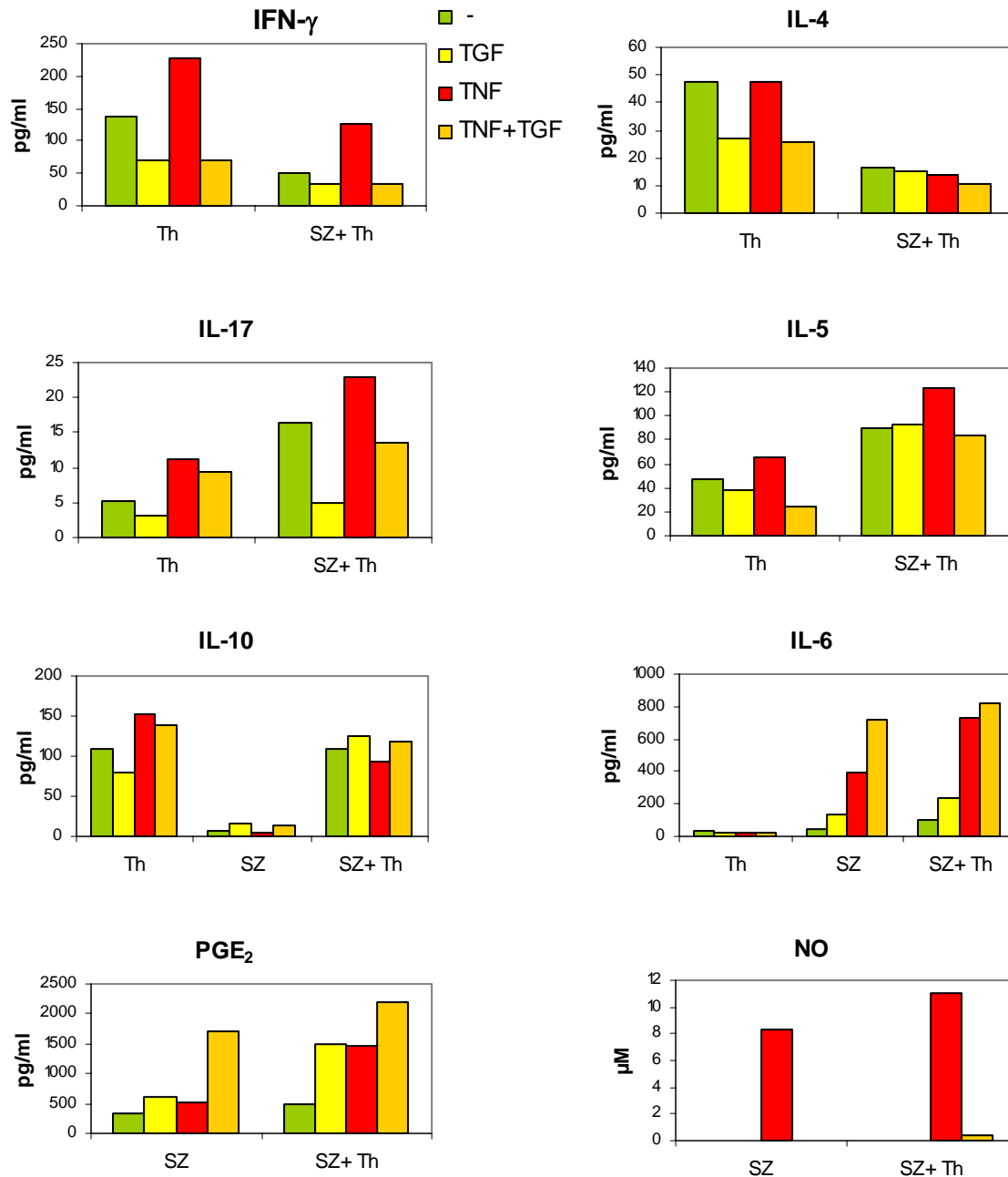


Abb. 39: Modulation der Zytokin-, PGE₂- und NO-Sekretion in Kokulturen von SZ mit Th-Zellen durch Zusatz von TGF- β 1 und/oder TNF- α

SZ wurden für 48 h allein oder mit stimulierten Th-Zellen aus der Milz von arthritischen Mäusen unter Zusatz von TGF- β 1 und/oder TNF- α kokultiviert. Anschließend wurden die Zytokine sowie PGE₂ mittels ELISA und NO mit Griess-Reagenz im Überstand analysiert (Konz. TNF- α : 100 U/ml, TGF- β : 5 ng/ml). Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 (IL-4, IL-5, IL-17) bzw. 3 (IFN- γ , IL-10, IL-6, PGE₂, NO) Experimenten.

Sowohl TGF- β 1 als auch TNF- α wirkten auf die IL-6- und PGE₂-Sekretion der SZ stimulierend. NO wurde nur durch TNF- α induziert. Die NO-Induktion durch TNF- α konnte mit TGF- β 1 fast vollständig gehemmt werden, auf IL-6 und PGE₂ wirkte TGF- β jedoch selbst stimulierend und verstärkte somit den Effekt von TNF- α (Abb.39).

In der Kokultur wurden diese Faktoren noch verstärkt. TGF- β zeigte jedoch eine geringere Wirkung auf die IL-6-Steigerung. Ein Grund dafür könnte sein, daß TGF- β 1 auf Th-Zellen einen entgegengerichteten Effekt hat: es hemmt die IL-6-Produktion in diesen Zellen. Da das IL-6-Signal von Th-Zellen jedoch schwach im Vergleich zu den von SZ ist, kommt diese Hemmung nur durch eine leichte Abschwächung des IL-6-Anstieges in der Kokultur zum Ausdruck. Aus dem gleichen Grund kommt es bei Zusatz von TGF- β 1 zur TNF- α -stimulierten Kokultur nicht weiter zu einer Steigerung des IL-6-Signales.

Als Wachstumsfaktor führte TGF- β 1 zur Proliferation der SZ, was sich in einer höheren Zellzahl am Ende der Kokultur widerspiegelte (Abb.40, rechts). Bezieht man das VCAM-1-Signal (Abb.40, links) auf die Zellmenge, so läßt sich bei Modulation mit TGF- β 1 auf einen sehr starken Rückgang der VCAM-1-Expression sowohl in der SZ-Monokultur als auch in der Kokultur schließen. TNF- α führte hingegen nur zu einem schwachen Anstieg der Zellzahl, aber starken Anstieg des VCAM-1-Signals, was auf eine starke Stimulierung der VCAM-1-Expression auf SZ schließen läßt. TGF- β 1 wirkte der VCAM-1-stimulierenden Wirkung von TNF- α sowohl in der reinen SZ-Kultur als auch in der Kokultur entgegen, während es die Zellzahl zusätzlich erhöhte. Die Erhöhung der Zellzahl durch TGF- β 1 könnte auch zum Anstieg anderer Meßparameter wie IL-6 und PGE₂ beigetragen haben.

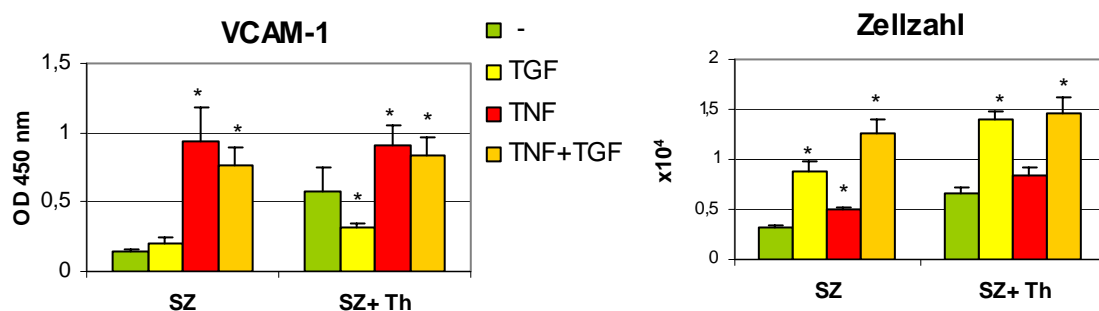


Abb. 40: VCAM-1-Expression und Zellzahl nach Modulation der Kokulturen mit TGF- β 1 und/oder TNF- α

SZ (7d AIA) wurden für 48 h allein oder mit Th-Zellen aus der Milz von arthritischen Mäusen (7d AIA) unter Zusatz von TGF- β 1 und/oder TNF- α kokultiviert. Anschließend wurde das VCAM-1-Signal im Zell-ELISA gemessen und die Zellzahl mit Kristallviolett bestimmt (Konz. TNF- α : 100 U/ml, TGF- β : 5 ng/ml). Dargestellt ist ein Experiment mit Mittelwerten und Standardabweichungen von 4 Parallel-Ansätzen (repräsentatives Beispiel von 3 Experimenten). Signifikante Unterschiede von modulierten (TGF, TNF, TNF+TGF) SZ bzw. Kokulturen (SZ+Th) zu unmodulierten SZ bzw. Kokulturen (-) sind mit * gekennzeichnet (* p \leq 0,05).

TNF- α ist bekannt für seine MMP-stimulierende Eigenschaft. Aus diesem Grunde ist eine starke Zunahme der MMP-9-Bande im Gelatine-Zymogramm und der MMP-3-Bande im Casein-Zymogramm zu erkennen (Tab.16). TGF- β 1 bewirkte ebenfalls eine MMP-9-Zunahme und verstärkte den stimulatorischen Effekt von TNF- α , was aber auch auf die höhere Zellzahl zurückgeführt werden könnte, denn bisher sind für TGF- β 1 hauptsächlich hemmende Einflüsse auf MMP beschrieben (Kerr et al., 1990; Yuan und Varga, 2001). TGF- β 1 führte aber auch zu einer starken TIMP-2-Zunahme, und in einigen Fällen induzierte es zusätzlich geringfügig TIMP-1. TNF- α zeigte nur eine schwach-stimulierende Wirkung auf die TIMP-Produktion. Obwohl sich in den Zymogrammen nur eine schwache Verringerung der MMP-3-Bande in den TNF- α -stimulierten SZ durch Modulierung mit TGF- β 1 erkennen ließ, waren die Aktivitäten gegenüber Peptid 2, einem relativ spezifischen Substrat für MMP-3, im Fluoreszenzassay deutlich reduziert (Abb.41 rechts). Hier wirkten sich eine schwache MMP-3-Suppression und eine starke TIMP-Induktion insgesamt hemmend auf die MMP-3-Aktivität aus. Hingegen war mit dem Substrat Peptid 1 eine stärkere Aktivität nach Modulierung mit TGF- β 1 bei TNF- α -Stimulierung nachweisbar (Abb.41, linkes Diagramm), was sich auf den erhöhten MMP-9-Level zurückführen ließe. Diese verstärkte MMP-Aktivität deutet darauf hin, daß die MMP-Aktivität durch TGF- β 1 direkt beeinflußt wird und nicht nur auf eine stärkere Proliferation zurückgeführt werden kann, da offensichtlich das Verhältnis der MMP zu TIMP verschoben wurde. Die Daten bezeugen, daß TGF- β 1 eine Verschiebung des MMP-Wirkungsspektrums ermöglicht, was zu einer verstärkten MMP-9-, aber geringeren MMP-3-Aktivität führt.

Tab.16: MMP und TIMP in Kultur- und Kokulturüberständen von SZ moduliert mit Zytokinen

	SZ	SZ +TGF- β 1	SZ +TNF- α	SZ +TGF- β 1 +TNF- α	SZ + Th	SZ + Th +TGF- β 1	SZ + Th +TNF- α	SZ + Th +TGF- β 1 +TNF- α
MMP-9	-	+	++	+++	+	++	+++	++++
MMP-3	-	-	+	+	-	-	++	+
TIMP-1	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)
TIMP-2	+	+++	++	+++	++	+++	++	+++

Stärke der MMP-Banden im Gelatine- (MMP-9) und Casein- (MMP-3) Zymogramm sowie der TIMP-Banden im reversen Zymogramm (- keine Bande, (+) schwache Bande in nur einigen Experimenten, + schwache Bande, ++ gut sichtbare Bande, +++ starke Bande, ++++ sehr starke Bande).

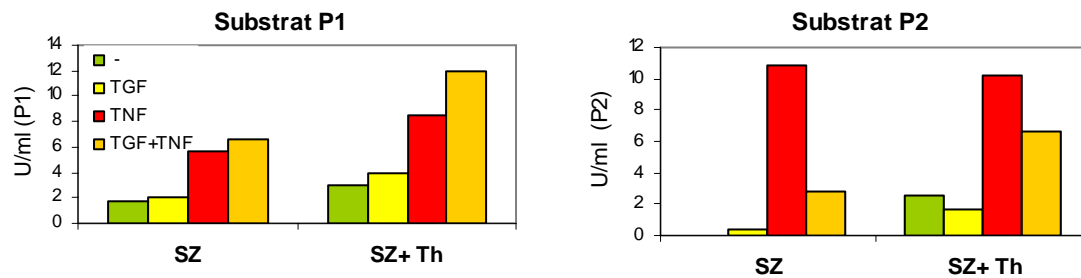


Abb. 41: MMP-Aktivität in Kokulturüberständen, Modulation mit TGF- β 1 und/oder TNF- α

SZ (7d AIA) wurden allein oder mit stimulierten Th-Zellen aus Milzen arthritischer Mäuse (7d AIA) unter Zusatz von TNF- α und/oder TGF- β 1 48 h kokultiviert. Die MMP-Aktivität in den Kulturüberständen wurde nach Aktivierung mit APMA im Fluoreszenzassay gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 3 Experimenten. (Konz. TNF- α : 100 U/ml, TGF- β 1: 5 ng/ml).

3.7.2 Modulation mit IFN- γ

Da IFN- γ auf der einen Seite proinflammatorische Eigenschaften aufweist und auf der anderen Seite die MMP-Induktion in stimulierten SZ inhibieren kann (siehe Kap.3.1), sollte untersucht werden, welche modulierende Wirkung IFN- γ auf die Interaktionen zwischen SZ und Th-Zellen ausüben kann. IFN- γ führte in reinen Th-Zellkulturen zu einer Supprimierung von IL-4 und IL-5. In der Kokultur hingegen konnte keine Inhibierung mehr nachgewiesen werden, im Gegenteil die IL-4- und IL-5-Level waren tendenziell sogar leicht erhöht (Abb.42). Auf die IL10- und IL-17-Sekretion übte IFN- γ keinen wesentlichen Einfluß aus.

IFN- γ induzierte oder verstärkte aber die Sekretion von NO und IL-6 sowohl in SZ-Monokulturen als auch in Kokulturen mit Th-Zellen (Abb.42). Auf PGE₂ zeigte IFN- γ keine effektive Wirkung.

IFN- γ führte häufig zu einer Abnahme der Zellzahl in SZ-Monokulturen und etwas stärker in Kokulturen, was auf eine anti-proliferative Wirkung von IFN- γ zurückgeführt werden kann. Für VCAM-1 waren nur geringe, nicht signifikante Steigerungen durch IFN- γ in der Kokultur zu beobachten (Ergebnisse nicht dargestellt).

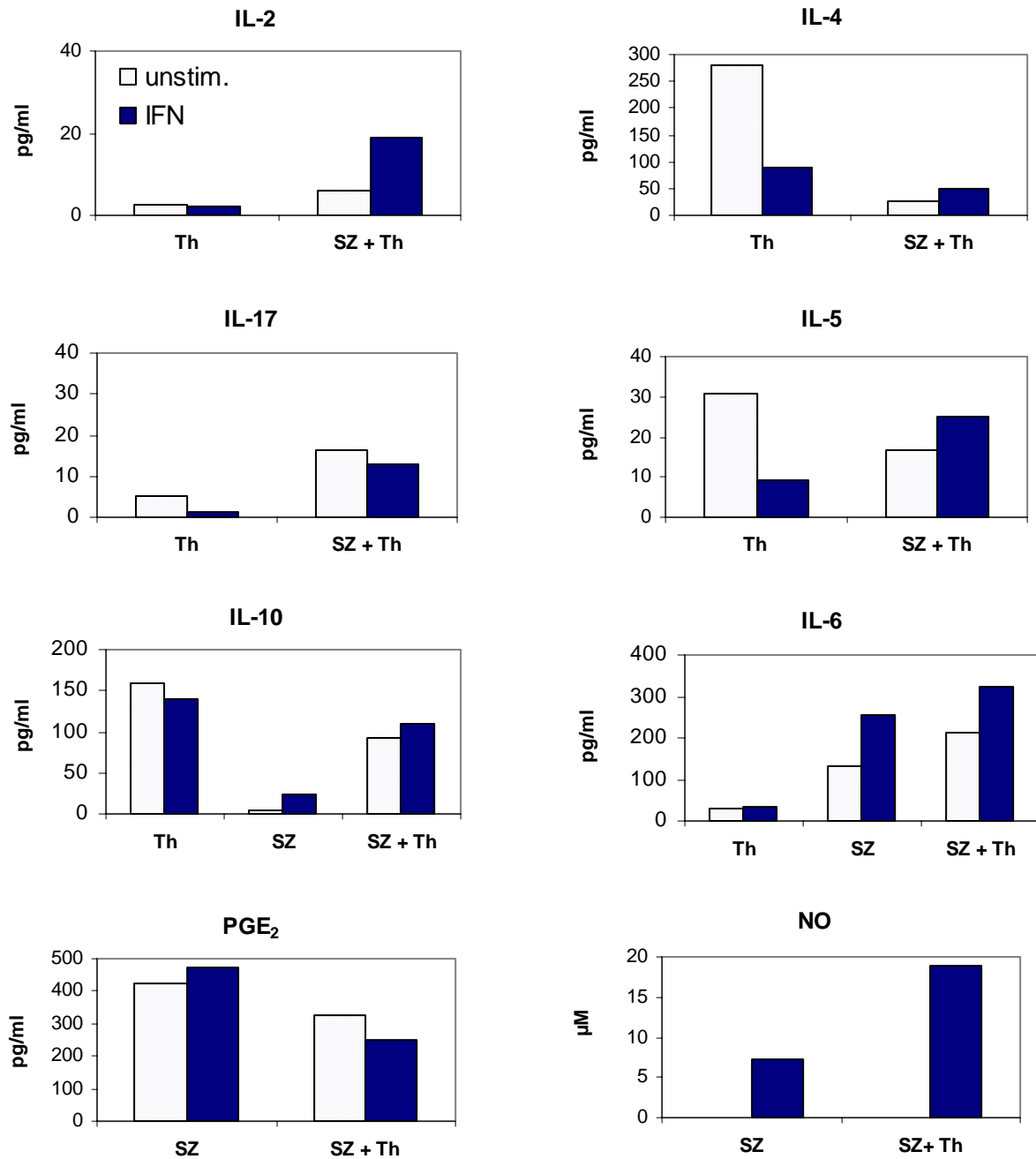


Abb. 42: Modulation der Zytokin-, PGE₂- und NO-Sekretion in Kokulturen mit IFN-γ

Kokultur von SZ (7d AIA) mit stimulierten Th-Zellen aus Milzen arthritischer Mäuse (7d AIA) mit (IFN) oder ohne (-) Zusatz von 100 U/ml IFN-γ. Nach 48 h Kultur wurden in den Überständen die Zytokine und PGE₂ mit ELISA und NO mit Griess-Reagenz gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 Experimenten.

Für die MMP-Produktionen waren bei steigenden IFN- γ -Konzentrationen keine eindeutigen Zu- oder Abnahmen in den Zymogrammen nachweisbar. Ebenso zeigte IFN- γ keinen eindeutigen Einfluß auf TIMP-1 und TIMP-2 im reversen Zymogramm (Ergebnisse nicht dargestellt). Sind Effekte sichtbar, sind diese vermutlich nur auf eine veränderte Proliferation der Zellen zurückzuführen und stellen keinen direkten Einfluß von IFN- γ dar. Dies spiegeln auch die MMP-Aktivitäten im Fluoreszenzassay wider (Abb.43). Die im rechten Diagramm in Abb.43 zu erkennenden Abnahmen der Aktivität gegenüber Peptid 1 sind vermutlich nur auf eine Abnahme der Zellzahl zurückzuführen, die in dem dargestellten Versuch relativ stark war. Eine MMP-3-inhibierende Wirkung von IFN- γ auf SZ, wie sie für LPS- und TNF- α -stimulierte SZ beobachtet wurden (Kap.3.1), trat bei den mit Th-Zellen stimulierten SZ also nicht auf.

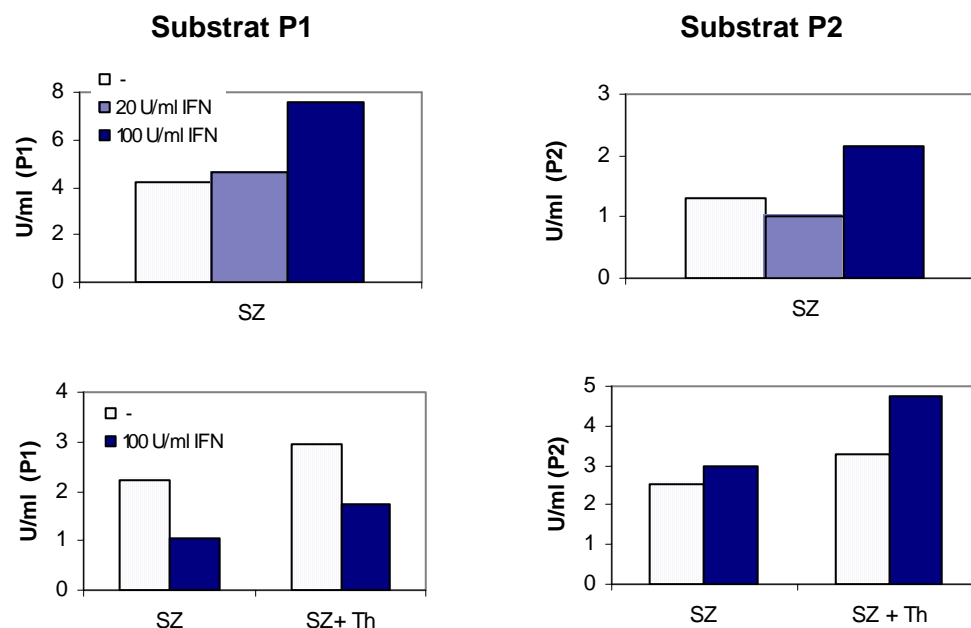


Abb.43: MMP-Aktivität in Kultur- und Kokulturüberständen nach Modulation mit IFN- γ , Fluoreszenzassay

Obere Reihe: SZ (7d AIA) wurden für 48 h mit verschiedenen IFN- γ -Konzentrationen (20 und 100 U/ml) inkubiert. Untere Reihe: SZ (7d AIA) wurden mit stimulierten Th-Zellen aus Milzen arthritischer Mäuse (7d AIA) mit oder ohne IFN- γ (100 U/ml) für 48 h kokultiviert. Als Kontrolle wurden parallel SZ-Monokulturen mit und ohne IFN- γ angesetzt. In den Überständen wurde die MMP-Gesamtaktivität nach Aktivierung mit APMA im Fluoreszenzassay gemessen. 1.Spalte: Substratumsatz von Peptid 1 (P1), 2.Spalte: Substratumsatz von Peptid 2 (P2). Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 Experimenten.

3.7.3 Modulation mit IL-4

IL-4 ist ein Zytokin, das von Th2-Zellen gebildet wird. Da es die IFN- γ -Sekretion hemmt, wirkt es auf die Differenzierung von Th-Zellen zu Th1-Zellen supprimierend, während es die Th2-Differenzierung fördert. Ob eine Verschiebung der Subpopulationen in Kokulturen von SZ und Th-Zellen durch IL-4-Zusatz erreicht werden kann und welchen Effekt dies auf die SZ-Reaktionen hat, wurde in diesem Versuchsansatz getestet. Dazu wurden SZ (7d AIA) mit Th-Zellen, die 4 Tage zuvor mit PMA und Ionomycin stimuliert wurden, für 48 h mit und ohne IL-4-Zusatz kokultiviert.

IL-4 wirkte nur auf die IL-6- und PGE₂-Sekretion stimulierend (Abb.44). IL-4 erhöhte IL-6 sowohl in reinen Th-Zellkulturen als auch in den Kokulturen und PGE₂ in reinen SZ-Kulturen und Kokulturen.

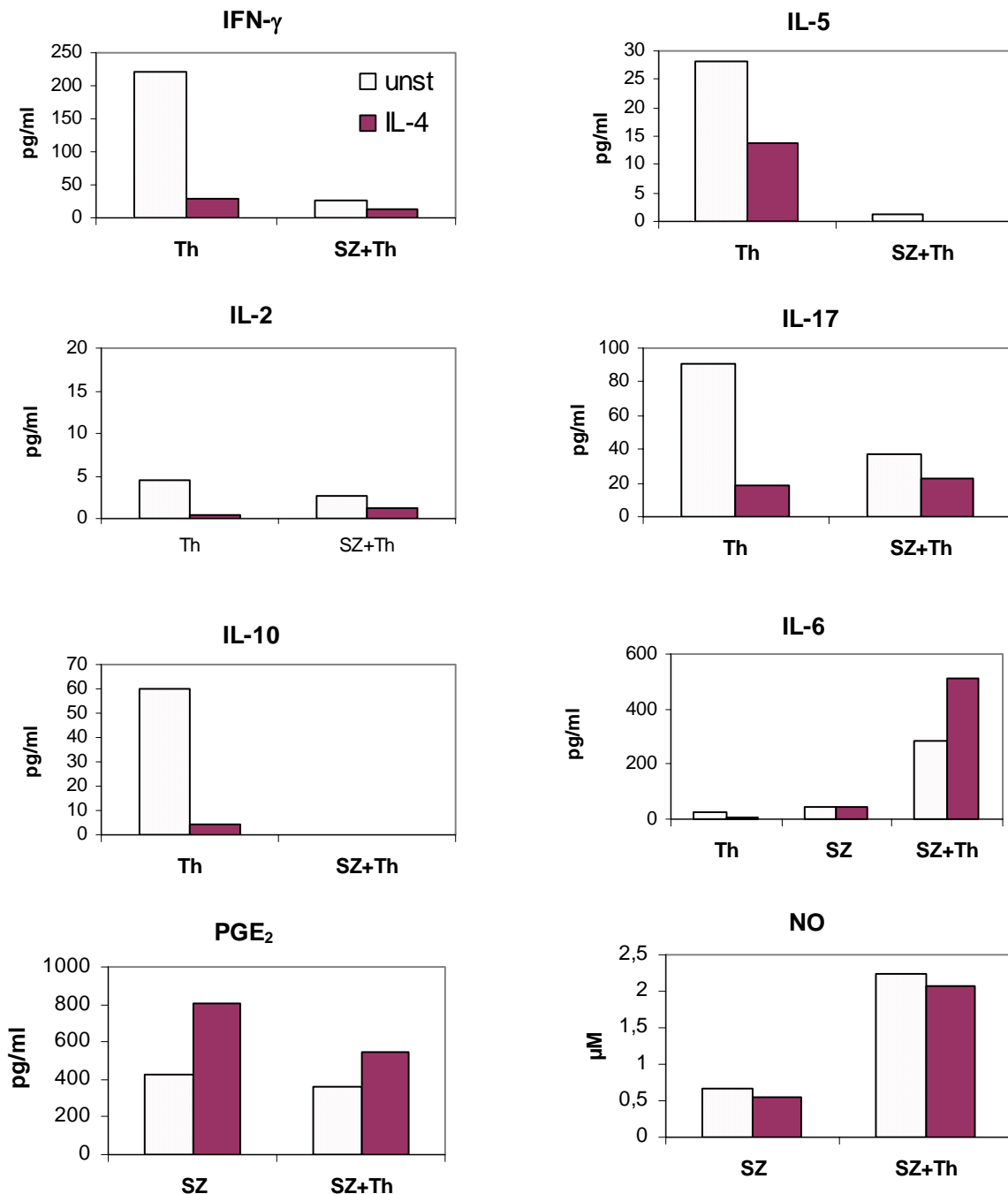


Abb. 44: Modulation der Zytokin-, PGE₂- und NO-Sekretion in Kokulturen von SZ mit Th-Zellen durch Zusatz von IL-4

SZ (7d AIA) wurden für 48 h allein oder mit stimulierten Th-Zellen aus der Milz von arthritischen Mäusen (7d AIA) mit oder ohne IL-4 kokultiviert. Anschließend wurden die Zytokine sowie PGE₂ mittels ELISA und NO mit Griess-Reagenz im Überstand analysiert (Konz. IL-4: 200 U/ml) Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 2 (IL-5, IL-10, PGE₂) bzw. 3 (IFN- γ , IL-2, IL-17, IL-6 und NO) Experimenten.

Auf sämtliche Th-Zytokine, d.h. IFN- γ , IL-17, IL-10, IL-2 und IL-5 hatte IL-4 eine supprimierende Wirkung, die aber nur eindeutig in den Th-Zell-Monokulturen nachgewiesen wurde (Abb.44). Die NO-Sekretion in SZ-Monokulturen und Kokulturen blieb durch IL-4 unverändert. Auf die Zellproliferation und die VCAM-1-Expression hatte IL-4 ebenfalls keinen meßbaren Einfluß (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die MMP-Aktivität war in der Kokultur nach IL-4-Stimulierung deutlich verringert. Im Gelatine-Zymogramm war eine leichte Abnahme der MMP-9-Bande durch IL-4 nur in der Kokultur zu erkennen, auf reine SZ hatte IL-4 kaum einen Einfluß (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies wird auch im Fluoreszenzassay erkennbar, wo die Aktivität gegenüber Peptid 1 in der Kokultur durch Zusatz von IL-4 konzentrationsabhängig abnahm (Abb. 45, linkes Diagramm). Im Casein-Zymogramm sah man eine Abnahme der MMP-3-Bande durch IL-4 auch nur in der Kokultur, was sich ebenfalls in einem geringeren Substratabbau von Peptid 2 im Fluoreszenzassay widerspiegelte (Abb.45, rechtes Diagramm). Dagegen wirkte IL-4 auf reine SZ leicht stimulierend auf die MMP-3-Aktivität, erkennbar an der konzentrationsabhängigen Zunahme des Substratumsatzes von Peptid 2. Im reversen Zymogramm ließ sich eine Steigerung von TIMP-2 in SZ-Monokulturen nachweisen, während die in der Kokultur gesteigerte TIMP-2-Produktion durch IL-4 nicht zunahm (Ergebnisse nicht dargestellt).

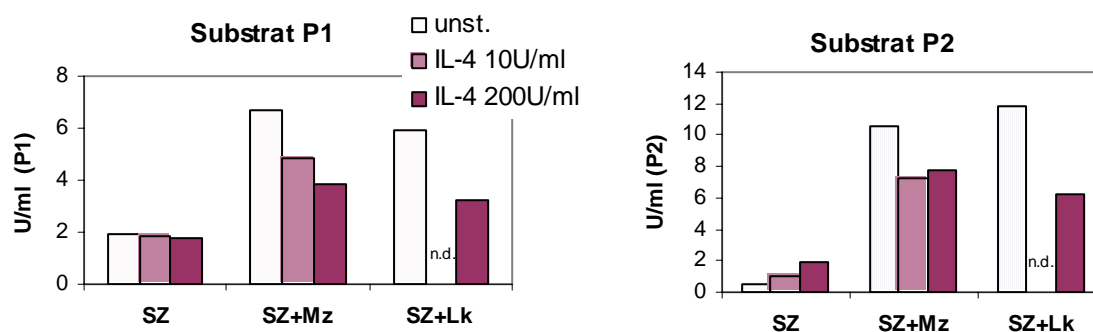


Abb. 45: MMP-Aktivität in Kultur- und Kokulturüberständen nach Modulation mit IL-4, Fluoreszenzassay

SZ (7d AIA) wurden mit stimulierten Th-Zellen aus Milzen (Mz) oder Lymphknoten (Lk) arthritischer Mäuse (7d AIA) mit oder ohne Modulation mit IL-4 (10 und 200 U/ml) für 48 h kokultiviert. Als Kontrolle wurden parallel SZ-Monokulturen mit und ohne IL-4 angesetzt. In den Überständen wurde die MMP- Gesamtaktivität nach Aktivierung mit APMA im Fluoreszenzassay gemessen. Links: Substratumsatz von Peptid 1 (P1), rechts: Substratumsatz von Peptid 2 (P2). Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von 3 Experimenten. (n.d.: nicht durchgeführt).

3.7.4 Zusammenfassung

Keines der eingesetzten Zytokine (TGF- β 1, IFN- γ , IL-4) führte zu einer allgemeinen Inhibierung der SZ-Aktivität, weder in SZ-Monokulturen noch in Kokulturen.

IL-4 und TGF- β 1 hemmten jedoch die MMP-Aktivitäten und steigerten die TIMP-2-Expression in den Kokulturen (Tab.17). IL-4 senkte sowohl die MMP-9- als auch die MMP-3-Expression und deren Aktivitäten gegenüber den entsprechenden Substraten, während TGF- β 1 nur die MMP-3-Expression und deren Aktivität hemmte, die MMP-9-Expression dagegen steigerte. TGF- β 1 konnte dafür im Gegensatz zu IL-4 die NO-Sekretion sehr effektiv hemmen. Auf PGE₂ und IL-6 wirkten beide Zytokine stimulierend.

IFN- γ , das auf die TNF- α - und LPS-induzierte MMP-Expression inhibierend wirkte (s. Kap.3.1), hatte in der Kokultur keinen wesentlichen Einfluß auf die MMP. Es führte in der Kokultur lediglich zum Anstieg von IL-6 und NO (Tab.17).

Tab. 17: SZ-Reaktionen bei Modulierung mit verschiedenen Zytokinen

Modulation durch	in	IL-6	NO	MMP-9	MMP-3	TIMP-2	PGE ₂
TGF- β 1	SZ	↑	↓	→	→	↑↑	(↑)
	KK	↑	↓	↑	↓	↑↑	↑
IFN- γ	SZ	↑	↑↑	→	→	(↑)	→
	KK	↑	↑↑	→	→	→	→
IL-4	SZ	→	→	→	(↑)	↑↑	(↑)
	KK	↑	→	↓	↓	↑	(↑)

Regulierung der SZ-Aktivität bezüglich der IL-6-, NO-, TIMP-2- und PGE₂-Sekretion sowie der MMP-9- und MMP-3-Aktivität durch Zusatz von TGF- β 1, IFN- γ oder IL-4 in SZ-Monokulturen (SZ) oder in Kokulturen von SZ mit stimulierten Th-Zellen (KK). Veränderungen im Vergleich zur unmodulierten SZ-Mono- bzw. Kokultur: → keine Veränderung, ↓ Inhibierung, (↑) nur schwacher Anstieg oder Anstieg in nur einigen Experimenten, ↑ deutliche Steigerung, ↑↑ sehr starke Steigerung.

4. DISKUSSION

Die Rheumatoide Arthritis ist durch eine starke chronische Entzündung gekennzeichnet, bei der autoimmune Angriffe gegen verschiedene Autoantigene auftreten. Der auslösende Faktor der Krankheit ist bisher unbekannt. Eine Reihe von therapeutischen Maßnahmen, die eine Supprimierung der immunologischen Vorgänge als Ziel haben, können das Voranschreiten der Krankheit zwar aufhalten, führen jedoch nicht zur Heilung. Bei Absetzen der Therapie kommt es zum Rebound-Effekt. Das bedeutet, daß während der Therapie ein oder mehrere Faktoren persistieren, die den Entzündungsprozeß immer wieder neu induzieren können. Hierbei muß es sich nicht unbedingt um den selben Faktor handeln, der ursprünglich zur Initiierung der Krankheit führte, sondern es kann sich auch um einen endogenen Faktor handeln, der erst durch die Krankheit entstanden ist und sich in einer permanenten Veränderung z.B. der Genexpression äußert.

Zur Aufklärung der Faktoren, die die chronische Entzündung aufrecht halten und zur Chronifizierung der Krankheit führen, müssen insbesondere die Wirkmechanismen der Immunzellen auf Zellen des Gelenkes sowie der Gelenkzellen auf die Immunzellen analysiert werden. Zwei Zelltypen, die besonders in die pathologischen Prozesse involviert sind, sind die Th-Zellen und die Synoviozyten der hyperplastischen Deckzellschicht der Gelenkinnenhaut. Die beiden Zelltypen kommen im rheumatoiden Gewebe in sehr engen Kontakt, insbesondere sind sie im Pannusgewebe nahe assoziiert. Denkbar wäre hierbei eine Aktivierung der Synoviozyten durch Kontakt mit T-Zellen, der zu einer länger andauernden Veränderung in den Synoviozyten führt. Da in den entzündeten Gelenken T-Zellen des Subtyps Th1 dominieren, bestand die Hypothese, daß diese ein stärkeres Aktivierungspotential in der RA besitzen, während Th2-Zellen, die die humorale Antwort mit Immunglobulin-Switchs zu IgG1 und IgE unterstützen und Th1-Reaktionen supprimieren, gegenregulatorische Funktionen haben könnten. Den Synoviozyten werden fernerhin einige immunmodulatorische Funktionen zugeschrieben, so daß auch ein Einfluß der Synoviozyten auf die T-Zellaktivität wahrscheinlich erschien. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, die Wechselwirkungen verschiedener Th-Subpopulationen mit Synoviozyten in einem Kokultursystem genauer zu untersuchen. Dazu wurde das sehr gut charakterisierte Tiermodell der Antigen-induzierten Arthritis in der C57BL/6-Maus verwendet, da dieses große Ähnlichkeiten mit der Rheumatoiden Arthritis aufweist, besonders hinsichtlich der histopathologischen Veränderungen der chronischen Entzündung und Gelenkdestruktion und der therapeutischen Beeinflußbarkeit.

4.1 Modulation der Synoviozytenaktivität durch Th-Zytokine

Zunächst wurde der Einfluß von löslichen Zytokinen, die typischerweise von Th-Zellen gebildet werden, auf Synoviozyten untersucht. Eine starke Stimulierung der Synoviozyten wurde durch TNF- α , IL-17 und zum Teil auch durch IFN- γ erreicht, während die Zytokine IL-2, IL-4 und IL-10 keine oder nur minimale Effekte zeigten. Als Parameter, die eine Stimulierung der Synoviozyten anzeigen, wurden die IL-6- und NO-Mengen, die MMP/TIMP-Verhältnisse in den Kulturüberständen

sowie die Expression von VCAM-1 auf der Zelloberfläche bestimmt. Bei diesen Parametern handelt es sich um Faktoren, die für die Entzündungs- und Destruktionsvorgänge in der Arthritis verantwortlich gemacht werden.

IL-6 kann als multifunktionales Zytokin angesehen werden, das besonders aktiv an der Regulierung der Akute-Phase-Antwort beteiligt ist. Weiterhin beeinflusst es die terminale Reifung der B-Lymphozyten und ist an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt. Außerdem kann es die Sekretion des Plasminogenaktivators, eine wichtige Vorstufe, die zur MMP-Aktivierung führen kann, steigern (Keyszer et al., 1994). Es wird angenommen, daß IL-6 in die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen involviert ist (Hirano et al., 1990). Studien mit IL-6-defizienten Mäusen zeigten, daß für die Initiierung der Antigen-induzierten Arthritis die Anwesenheit von systemischem IL-6 notwendig ist (Boe et al., 1999). Die nur sehr schwach ausgeprägte Arthritis in IL-6-defizienten Mäusen war verbunden mit einer verminderten Antikörperproduktion und einer stärkeren Th2-Antwort, aber nicht mit einer Veränderung der IL-1 β - und TNF- α -Expression in den entzündeten Gelenken (Ohshima et al., 1998).

Stickstoffmonoxyd, NO, ist ein hochreaktives gasförmiges Molekül mit kurzer Halbwertszeit. Es wirkt zytotoxisch und kann damit zu Schädigungen des Gewebes führen. Es hemmt die Expression des IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1RA) und die Aggrekan-Synthese. Des weiteren potenziert es die MMP-Aktivität und fördert die Apoptose in Chondrozyten (Clancy et al., 1998). Damit stellt NO ein wichtiges Molekül in der RA dar, das zur Ausprägung des Krankheitsbildes beitragen könnte. Auf der anderen Seite zeigten Studien an iNOS-*knockout*-Mäusen, daß NO bei der AIA über die Verminderung der Leukozyten-Adhäsion und -Infiltration antiinflammatorische Funktionen ausübt (Veihelmann et al., 2001).

Die sezernierten MMP spiegeln das Degradationspotential der Synoviozyten wider, das für die Invasion der Zellen des Pannusgewebes in den Knorpel und den Abbau des Knorpels und Knochens entscheidend ist. Die essentielle Funktion der MMP-3 bei der Aktivierung von MMP und beim Knorpelabbau ist durch Versuche an MMP-3-defizienten Mäusen belegt (van Meurs et al., 1999).

Die spezifischen Gewebsinhibitoren der MMP, die TIMP, sind im Verhältnis zu den MMP im arthritischen Gelenk unterrepräsentiert, so daß es zu einem verstärkten Abbau der extrazellulären Matrix durch MMP kommt. Carmichael et al. (1989) erzielten daher durch systemische Gabe von TIMP-1 in der Kollagen-induzierten Arthritis eine Abschwächung der Arthritis. TIMP haben neben der Inhibierung der MMP im Verhältnis 1:1 z. T. weitere wichtige Funktionen, wie die Regulierung der Zellmorphologie, Inhibierung der Angiogenese und Steroidogenese und die Regulierung von Apoptose. Eine bedeutende Aufgabe übernimmt TIMP-2 ferner bei der Aktivierung der MMP-2. Die Rolle des TIMP-2 bei der RA ist noch nicht geklärt. Auf der einen Seite wurde in der Synovialmembran von RA-Patienten weniger TIMP-2 nachgewiesen als in der von Patienten mit Gelenktrauma, auf der anderen Seite war TIMP-2 besonders stark an der Knorpel-Pannusgrenze exprimiert (Konttinen et al., 1998).

VCAM-1 (CD106) ist ein Adhäsionsmolekül, das u. a. auf der Zelloberfläche von Synoviozyten vorkommt und durch einige Entzündungsmediatoren hochreguliert werden kann. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung von aktivierten T-Zellen über den Liganden VLA-4 (very late antigen-4, $\alpha 4\beta 1$ -Integrin). Bei der RA ist sowohl die Expression von VCAM-1 auf Synoviozyten und Endothelzellen als auch VLA-4 auf T-Zellen erhöht. VCAM-1 trägt zudem an der Adhäsion der Synoviozyten an den Knorpel bei und ermöglicht somit seine Zerstörung durch Synoviozyten (Kriegsmann et al., 1995; Hersmann et al., 1998). Es ist außerdem an der Angiogenese beteiligt und fördert das Überleben von B-Zellen (Hayashida et al., 2000).

Von den stimulierend wirkenden Zytokinen ist nur das IFN- γ eindeutig dem Th1-Subtyp zuzuordnen. TNF- α , das eher den Th1-Zellen zugeschrieben wird, wurde in den Untersuchungen dieser Arbeit jedoch sowohl von Th1- als auch in etwas geringerem Maße von Th2-Zellen gebildet. IL-17, das von Memory-T-Zellen gebildet wird, konnte nicht IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen zugeordnet werden, wie es für das humane System bekannt ist (Aarvak et al., 1999). Es zeigte von den eingesetzten Zytokinen das stärkste Potential, Synoviozyten zu stimulieren, besonders hinsichtlich der Steigerung der Sekretion von NO, IL-6 und MMP. Da in den perivaskulären Arealen des rheumatischen Gelenkes eine hohe Anzahl von T-Zellen des Memory-Typs ($CD4^+CD29^+CD45RO^+$) nachweisbar ist (Cush und Lipsky, 1991; Wagner et al., 1998) und bei der RA auch erhöhte IL-17-Mengen in der Synovialflüssigkeit detektierbar sind (Ziolkowska et al., 2000), könnte dieses Zytokin eine ausgesprochen wichtige Funktion bei der Stimulierung der Synoviozyten spielen und den Degradationsprozeß vorantreiben, zumal es nicht nur MMP induziert, sondern auch deren Inhibitor TIMP-2 hemmt. Außerdem sind synergistische Effekte von IL-17 mit ruhenden T-Zellen (Yamamura et al., 2001) und mit IFN- γ auf die Produktion von Chemokinen (Andoh et al., 2001) beschrieben worden. Ferner wirkt IL-17 chemotaktisch auf Neutrophile Granulozyten (Fossiez et al., 1998), die durch die Freisetzung von Elastase nachweislich zur Degradation des Knorpels im Gelenk beitragen (Olszewski et al., 1996). IFN- γ führte zur gesteigerten IL-6- und NO-Produktion und auch VCAM-1 wurde durch IFN- γ verstärkt. Nach Stimulierung mit IFN- γ waren häufig weniger adhärente Zellen nachweisbar als in unstimulierten Synoviozyten-Kulturen. Dies könnte entweder auf eine verminderte Proliferation oder auf eine erhöhte Apoptoserate zurückgeführt werden. Eine antiproliferative Wirkung von IFN- γ ist in anderen Untersuchungen schon nachgewiesen worden (Billiau et al., 1998). Insbesondere die TNF- α -induzierte Proliferation wurde durch IFN- γ inhibiert (Alvaro-Gracia et al., 1990). Während IFN- γ aufgrund seiner stimulatorischen Wirkung auf die IL-6-, NO- und VCAM-1-Expression zur Entzündung beitragen kann, hat es auf den Degradationsprozeß scheinbar keinen direkt fördernden Einfluß, da weder MMP- noch TIMP-Expressionen stark verändert wurden. Im Gegenteil, auf die MMP-Sekretion stimulierter Synoviozyten wirkte es sogar stark supprimierend, indem es die MMP-Gesamtaktivität sowohl in LPS- als auch in TNF- α -stimulierten Synoviozyten hemmte. Auf IL-1 β -stimulierte Synoviozyten zeigte es jedoch kaum eine inhibierende Wirkung bezüglich der MMP-Aktivität. Solche Befunde sind auch für Synoviozyten aus RA-Patienten beschrieben worden: auch

hier führte IFN- γ zu einer Senkung von TNF- α -induzierter Kollagenase, hatte dagegen keinen Einfluß auf die IL-1 β -induzierte Kollagenase-Synthese (Alvaro-Gracia et al., 1990). Diese Beobachtung könnte im Krankheitsgeschehen von großer Bedeutung sein, da neben TNF- α im wesentlichen IL-1 β im arthritischen Gelenk dominiert und den Degradationsprozeß vorantreibt, wie Therapieansätze mit IL-1RA belegen konnten (Cohen et al., 2002). Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß IFN- γ in Synoviozyten LPS-induziertes IL-1 β und TNF- α sehr stark hemmen kann und damit möglicherweise sowohl die Induktion matrixdegradierender Proteasen als auch den Entzündungsprozeß vermindern kann. Eine Inhibierung der LPS-induzierten IL-1-Synthese in Makrophagen wurde auch von DeBoer et al. (2001) dargestellt. Welche der beschriebenen Funktionen des IFN- γ *in vivo* eine dominante Rolle spielen, ist zur Zeit noch Gegenstand der Diskussion, denn in verschiedenen Th1-vermittelten Autoimmun-Modellen wurden paradoxe Wirkungen beobachtet (Rosloniec et al., 2002). TNF- α ist ein sehr wichtiger Faktor, der zum Krankheitsgeschehen beiträgt, besonders zur Entzündung, aber auch zur Degradation. Dies zeigten auch die MMP-, NO- und IL-6-Sekretionen der Synoviozyten nach Stimulierung mit TNF- α . Aus diesem Grund führen Therapien, bei denen das Zytokin blockiert wird, zu sehr guten Erfolgen, allerdings birgt die Therapie das Risiko einer höheren Infektionsgefahr und der Entstehung von Tumoren. *In vivo* wird löslicher TNF- α im arthritischen Gelenk im wesentlichen von Makrophagen gebildet und weniger von T-Zellen. Auf T-Zellen kommt TNF- α jedoch zu einem großen Teil membrangebunden vor, so daß man hier einen Effekt bei direktem Zell-Kontakt vermuten kann. Diese Fragestellung wurde in der Kokultur mit T-Zellen aus TNF- α -defizienten Mäusen detailliert untersucht.

IL-4 und IL-10 führten nur zu einer geringfügigen Stimulierung der Synoviozyten: IL-10 zur IL-6- und IL-4 zur MMP-3-Stimulierung. Beide Zytokine erhöhten auch die TIMP-2-Sekretion.

4.2 Modulation der Synoviozytenaktivität durch CD4⁺ und CD4⁻ T-Zellen

Um den direkten Einfluß von Th-Zellen auf Synoviozyten zu analysieren, wurden zunächst Kokulturen von Synoviozyten mit CD4⁺ T-Zellen und CD4⁻ T-Zellen verglichen. Eine Reihe von Untersuchungen belegen bisher die essentielle Rolle der CD4⁺ Zellen: So ermöglichten Petrow et al. (1996a) eine Übertragung der AIA auf SCID-Mäuse nur mit CD4⁺ T-Zellen, aber nicht mit CD4-depletierten T-Zellen. Ebenso deuten gute Therapieerfolge mit CD4-depletierenden Antikörpern (Pohlers, 2000) oder mit T-Zell-gerichteten Immunsuppressiva wie z.B. Cyclosporin A, FK506, Rapamycin oder Leflunomid (Thoss et al., 1996) auf die Rolle der entsprechenden Zellen hin. In CD4-defizienten Mäusen war eine Antigen-induzierte Arthritis zwar noch induzierbar, aber mit wesentlich geringerer Stärke (Simon, 2000), und in MHC-II-defizienten Mäusen war die Arthritis nicht mehr induzierbar. Es war daher zu erwarten, daß CD4⁺ T-Zellen auch zu einer stärkeren Stimulierung der Synoviozyten führen als die CD4⁻ Zellpopulation.

Diese Hypothese konnte mit den Kokulturanätzen bestätigt werden. Die Kokultur mit den CD4⁺ T-Zellen führten zu einer stärkeren VCAM-1-Expression und zu einer wesentlich höheren Freisetzung von NO, IL-6 und MMP. In einigen Fällen war auch eine erhöhte TNF- α -Sekretion nachweisbar.

Die beobachteten Differenzen können nicht auf einen unterschiedlichen Aktivierungszustand der Zellen zurückgeführt werden, da sowohl die CD4⁺ als auch die CD4⁻ Zellen 3 Tage vor der Kokultivierung gleichermaßen polyklonal stimuliert wurden und gleiche Mengen an IL-2 freisetzten. Allerdings sezernierten die CD4⁺ Zellen mehr IFN- γ , welches zum stärkeren NO- und IL-6-Signal beigetragen haben kann.

Des weiteren führten die CD4⁺ Zellen zu einer starken Erhöhung des VCAM-1-Signals auf den Synoviozyten. Die Induktion von VCAM-1 könnte hierbei im wesentlichen auf membranständige Faktoren zurückgeführt werden, da es bei Trennung der T-Zellen und Synoviozyten durch Membraneinsätze zu einer geringeren Steigerung kam. Auch Bombara et al. (1993) und Burger und Dayer (1998) wiesen nach, daß die VCAM-1-Induktion auf humanen synovialen Fibroblasten über direkten T-Zellkontakt erfolgt. VCAM-1 könnte bei der Interaktion von Synoviozyten mit T-Zellen auch eine kostimulatorische Funktion übernehmen. Darauf weisen die Untersuchungen von Yamamura et al. (2001) mit ruhenden T-Zellen hin. Die durch Kristallviolett bestimmte Zellzahl der Synoviozyten war nach Kokultur mit CD4⁺ T-Zellen ebenfalls erhöht, was wahrscheinlich auf eine verminderte Apoptose zurückgeführt werden kann, da bei Untersuchungen mit dem Apodirekt-Kit eine Reduzierung der Apoptose in Synoviozyten um ca. 65% erkennbar war. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, daß T-Zellen, die durch starke Adhäsion nach der Kultur an den Synoviozyten haften blieben, ebenfalls geringfügig zum Kristallviolett-Signal beigetragen haben. Im Lichtmikroskop war erkennbar, daß nach der Kokultur und Spülen des Zellrasens mit PBS noch relativ viele T-Zellen auf den Synoviozyten haften geblieben waren. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten die T-Zellen vorwiegend auf den mit Mikrovilli besetzten Fortsätzen der Synoviozyten lokalisiert. Auch die T-Zellen bildeten an einigen Stellen lappenartige Ausstülpungen, die zur Oberfläche der Synoviozyten hingerrichtet waren.

Im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellen führte die CD4⁻ Population zu keiner oder nur zu einer schwachen Stimulierung der Synoviozyten, auf die PGE₂-Produktion wirkte sie sogar supprimierend. Stimulierte CD4⁻ Zellen bewirkten eine starke Inhibierung der PGE₂-Sekretion, während unstimulierte CD4⁺ T-Zellen nur schwach inhibierten, stark stimulierte CD4⁺ T-Zellen dagegen sogar zu einer Steigerung der PGE₂-Synthese führten. Eine gesteigerte PGE₂-Synthese in Synoviozyten nach direktem Zellkontakt mit stimulierten T-Zellen wurde auch von Burger et al. (1998) für das humane System nachgewiesen. PGE₂ weist eine Reihe von antiinflammatorischen Eigenschaften auf, neben der Inhibierung der T-Zellaktivität in bestimmten Subsets kann es LPS-induziertes IL-10 verstärken, jedoch allein kein IL-10 induzieren (Aloisi et al., 1999). Es wirkt damit antagonistisch zu IFN- γ . Außerdem hemmt PGE₂ die LPS-induzierte TNF- α -Produktion, die Synthese von MHC I, Adhäsionsmolekülen, IL-12 (Caggiano und Kraig, 1998) sowie in Makrophagen die basale und IL-17-

induzierte MMP-9-Synthese (Jovanovic et al., 2001). Auf der anderen Seite kann PGE_2 auch proinflammatorisch wirken, indem es über den Rezeptor EP4 die Synthese von IL-1 und IL-6 vermitteln kann (McCoy et al., 2002). Außerdem wurden in EP4-defizienten Mäusen mit Kollagen-Antikörper-induzierter Arthritis geringere MMP-2- und MMP-13-Mengen nachgewiesen, die mit einer geringeren Knochenresorption verbunden sind.

Zu der Verringerung der Aktivität in den Synoviozyten durch die CD4^+ Zellen könnten CD8^+ Zellen in dieser Population geführt haben, denen auch schon von Petrow et al. (1996a) herunterregulierende Funktionen zugeschrieben wurden. Klimiuk et al. (1999b) konnten ebenfalls in einem Transferexperiment entsprechende Effekte durch CD8^+ Zellen nachweisen: Nach Transfer in SCID-Maus-Chimeren mit humanem Synovium nahmen die $\text{IFN-}\gamma$ -, IL-1 β - und $\text{TNF-}\alpha$ -Konzentrationen in ihren Versuchen ab, was sie auf die anergisierende Funktion von IL-16 zurückführten, welches von CD8^+ Zellen gebildet wird. Da IL-1 β und $\text{TNF-}\alpha$ im arthritischen Gelenk die dominierenden Monokine darstellen, könnten auch die gegensätzlichen Reaktionen der CD4^+ und CD8^+ Zellen auf diese Zytokine, wie sie von Johnatty et al. (1997) geschildert wurden, von Bedeutung sein: CD8^+ Zellen reagierten hier auf diese Zytokine mit einer verminderten MMP-9-Sekretion, während CD4^+ Zellen mit einer verstärkten MMP-9-Sekretion reagierten. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten in den Kulturüberständen der T-Zellen keine MMP-Aktivitäten mit der Zymographie oder im Fluoreszenzassay nachgewiesen werden. Sollten diese Zellen MMP-9 sezerniert haben, so waren deren Mengen um ein vielfaches geringer als die von Synoviozyten freigesetzten MMP. Die von den T-Zellen freigesetzten MMP spielen wahrscheinlich nur für deren Einwanderung ins entzündete Gewebe eine wesentliche Rolle. Eine zytotoxische Funktion der CD4^+ Zellpopulation in dem angesetzten Kokultursystem erscheint hingegen unwahrscheinlich, da die Zellzahl der Synoviozyten nach der Kokultur nicht abgenommen, sondern zugenommen hat, allerdings geringer als in der Kokultur mit CD4^+ T-Zellen.

Die Kokulturexperimente mit Membraneinsätzen verdeutlichten die Funktion membranständiger Faktoren für die Stimulierung der Synoviozyten durch CD4^+ Zellen: Die Unterbindung des direkten Zell-Zell-Kontaktes führte zu einer wesentlich geringeren IL-6-, NO- und MMP-Induktion.

Auch in der Literatur gibt es einige Hinweise darauf, daß die Stimulierung von Synoviozyten durch T-Zellen im wesentlichen über membranständige Faktoren stattfindet. Es werden Interaktionen über CD6-CD116 (Joo et al., 2000), VCAM-1 mit VLA-4, LFA-3 oder CD29 und ICAM-1 mit CD18 (Bombara et al., 1993), CD40-CD40L (Harigai et al., 1999), IL-2R (CD25) (Corrigall et al., 2001), LFA-1 (Rinaldi und Schwarz-Eywill, 1999) sowie den membranständigen Zytokinen $\text{IFN-}\gamma$ (Chizzolini, 1998), $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 (Burger et al., 1998; Burger und Dayer, 1998) diskutiert. Interaktionen über die Moleküle CD69, CD154 und CD116 erscheinen hingegen eher unwahrscheinlich (McInnes et al., 2000). Für die meisten Vermittlungen über membranständige Faktoren scheint jedoch ein aktivierter Zustand der T-Zellen notwendig zu sein (Rezzonico et al., 1998).

4.3 Hemmung der Apoptose durch Zellkontakt

Für die Untersuchung der Apoptose wurden Synoviozyten aus arthritischen Gelenken mit nicht adhärennten MNZ kokultiviert, die überwiegend Lymphozyten enthielten. Die Kokulturen führten zu einer extremen Hemmung der Apoptoserate sowohl in Synoviozyten als auch in den MNZ. Untersuchungen von Salmon et al. (1997) zeigten, daß die Hemmung der Apoptose in T-Zellen entweder durch Kontakt mit synovialen Fibroblasten oder durch Stimulation über die IL-2R γ -Kette mit IL-2 oder IL-15 erfolgen kann. Vermutlich wird die Apoptose der synovialen T-Zellen durch IL-15 reguliert, das von Synoviozyten sezerniert wird (Harada et al., 1999). Auch das von Fibroblasten gebildete PGE₂ kann den Aktivierungs-induzierten Zelltod von T-Zellen über eine Caspase-Inhibierung vermindern (Yarovinsky und Hunninghake, 2001). Anergische T-Zellen könnten der Apoptose durch Stimulierung mit IFN- α oder IFN- β , das von Synoviozyten gebildet wird, entkommen (Akbar et al., 2000; Lombardi, et al., 2000). Welche Mechanismen zu einer Verminderung der Apoptose in Synoviozyten durch T-Zellen führen, ist noch unklar. In humanen Synoviozyten hat man durch Inkubation mit den Zytokinen IL-4 und IL-13 eine Verringerung der Apoptose erzielen können (Relic et al., 2001). Da in den hier durchgeführten Untersuchungen Th2-Zytokine nur in geringen Mengen nachweisbar waren, erscheint eine solche Regulierung in den Kokulturen unwahrscheinlich.

Die beobachtete Apoptosehemmung könnte eine Erklärung für die starke Hyperplasie im arthritischen Gelenk sein, denn in der synovialen Deckzellschicht und in Bereichen, in denen Knorpel- und Knochenzerstörung stattfinden, gibt es einige Hinweise auf eine gestörte Apoptose in RA-Patienten: Typische Apoptosemarker wie Fas sind kaum nachweisbar (Matsumoto et al., 1996), statt dessen werden anti-apoptotische Faktoren wie Sentrin (Franz et al., 2000) und Bcl-2 exprimiert.

Bei der Regulierung der Apoptose hat außerdem die extrazelluläre Matrix einen wesentlichen Einfluß. Dies belegen die Experimente auf den verschieden beschichteten Platten. Der Einfluß der Matrix auf die Apoptose wurde auch schon 1995 von Roskelley et al. (1995) beschrieben. Insbesondere die ubiquitären Matrices Kollagen und Fibronectin führten zu einer erhöhten Vitalität der Zellen. Das ungleichmäßige Wachstum der Fibroblasten auf Laminin und Poly-D-Lysin könnte durch die Ladung der Matrixmoleküle bedingt sein. So können die Moleküle als Poly-Kationen fungieren und damit zum Entzug der Glucosaminoglycane (GAG) führen, die um die Zellen gelagert sind, was eine Zusammenlagerung der Zellen zur Folge hat. Kittlick (1885) weist außerdem darauf hin, daß Matrices auch auf die Synthese der GAG selbst Einfluß nehmen können. So kommt es durch Poly-L-Lysin zur verminderten Synthese von GAG in Fibroblasten. Kollagen auf der anderen Seite weist durch seine vielen Aminosäuren anionischen Charakter auf und stimuliert die GAG-Synthese. In der vorliegenden Arbeit führten Kollagen und Fibronectin in der 48-stündigen Kokultur jedoch zu keiner starken Veränderung der MMP-Aktivität. Dies könnte an der relativ kurzen Dauer der Kultur liegen, so daß erst geringe Mengen an Spaltprodukten entstehen konnten, die die Aktivitäten stimulieren können.

4.4 Stimulierung der Synoviozyten in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand der Th-Zellen

Frisch isolierte Th-Zellen aus unbehandelten Mäusen (ruhende Th-Zellen) konnten Synoviozyten in der Kokultur ebenfalls zur Produktion von IL-6, NO, VCAM-1 und MMP anregen, wenn auch in erheblich niedrigerem Ausmaß als Th-Zellen aus Milzen und Lymphknoten arthritischer Tiere. Die Stärke der Aktivierung scheint vom Aktivierungszustand der Th-Zellen abhängig zu sein. Th-Zellen aus Mäusen mit akuter Arthritis und Th-Zellen aus Mäusen mit einem akuten Entzündungsschub in der chronischen Phase stimulierten die Synoviozyten stärker als Th-Zellen aus gesunden Mäusen oder aus der chronischen Phase.

Ein bemerkenswerter Unterschied zwischen Th-Zellen aus normalen und arthritischen Tieren zeigte sich in der TIMP-Induktion sowie in der Inhibierung der PGE₂-Synthese. Die Th-Zellen aus den normalen Tieren führten hier zu einer deutlich stärkeren TIMP-2-Synthese. Burger et al. (1998) haben für die Induktion des TIMP-1 eine Abhängigkeit von der Stimulierung der T-Zellen nachgewiesen: nur T-Zellmembranen von kurz (2 - 4 h) stimulierten T-Zellen, jedoch nicht von länger stimulierten T-Zellen führten zu einer Induktion von TIMP-1. In den hier untersuchten Kokulturüberständen war im reversen Zymogramm kein TIMP-1 erkennbar, da er entweder nicht oder nur gering induziert wurde. Für TIMP-2 kann aber eine ähnliche Regulierung angenommen werden, da die aus arthritischen Tieren gewonnen Th-Zellen, die eine stärkere Aktivität zeigten, zu einer geringeren TIMP-2-Stimulierung führten.

Th-Zellen sowohl aus arthritischen als auch aus normalen Mäusen bewirkten eine Inhibierung der PGE₂-Synthese, wobei die aus normalen Tieren stärker hemmten. Diese Hemmung steht im Gegensatz zu der Steigerung der PGE₂-Synthese durch Kokultur mit zuvor mitogen stimulierten Th-Zellen. Dieses deutet darauf hin, daß die PGE₂-Hemmung um so stärker ausgeprägt ist, je weniger die Th-Zellen aktiviert sind und daß bei sehr starker Stimulierung der Th-Zellen diese sogar zu einer Steigerung der PGE₂-Produktion führen. Als Inhibierungsfaktoren könnten die Zytokine IL-13 (Seitz et al., 1996) und IFN- β (Smeets et al., 2000) wirken, die von Th2-Zellen bzw. Fibroblasten gebildet werden, die jedoch in den Kokulturen hier nicht analysiert wurden. Die Inkubation von Synoviozyten mit Überständen von *in vitro* generierten Th2-Zellen führte allerdings zu einer Hemmung der PGE₂-Synthese, was möglicherweise auf IL-13 zurückgeführt werden kann. Auch Osteopontin, das in synovialen Fibroblasten bei der RA nachweisbar ist (Petrow et al., 2000), kann als PGE₂-Inhibitor fungieren (Attur et al., 2001). Für die Induktion von PGE₂ durch stark stimulierte Th-Zellen scheinen membranständige Faktoren auf den aktivierten T-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen, da bei den Kokulturen mit Membraneinsätzen die PGE₂-Produktion stark zurückging. Eine Involvierung von membranständigen Faktoren wurde auch von Burger et al. (1998) gezeigt. Sie konnten durch Kultivierung von synovialen oder Haut-Fibroblasten mit fixierten Membranen von aktivierten T-Zellen eine Steigerung der PGE₂-Synthese beobachten. Zur Stimulierung tragen wahrscheinlich insbesondere membranständiges IL-1 α und TNF- α bei. Auch eine Stimulierung über CD40L erscheint möglich (Graf Beth et al., 1999). Außerdem können restimulierte arthritische

Memory-T-Zellen IL-17 freisetzen, welches ebenfalls zur PGE₂-Induktion beitragen kann (Fossiez et al., 1998).

4.5 Regulierung der T-Zellaktivität durch Synoviozyten

Für die Reaktivität der Synoviozyten ist der Aktivierungszustand der T-Zellen wichtig, denn ruhende T-Zellen führten zu einer schwächeren Aktivierung der Synoviozyten als stimulierte T-Zellen. Aus diesem Grund wurde auch die Reaktion der T-Zellen auf Kontakt mit Synoviozyten und deren löslichen Mediatoren untersucht. Deutlich war eine Suppression von *in vitro* stimulierten T-Zellen aus arthritischen Mäusen wie auch aus gesunden Mäusen (*in vitro* generierte Th-Subpopulationen) durch Synoviozyten zu beobachten. Hierbei war es unerheblich, ob es sich um Th1- oder Th2-Subpopulationen handelt: In den Th1-Zellen wurde die IFN- γ -Sekretion stark gehemmt, in den Th2-Zellen die IL-4-Sekretion. Zu einem erheblichen Teil erfolgte die Suppression durch lösliche Faktoren, wie die Versuche mit den Membraneinsätzen zeigten. Vermutlich ist an der Inhibierung überwiegend PGE₂ beteiligt, das in großen Mengen von Synoviozyten synthetisiert wird. PGE₂ ist bekannt für seine suppressive Wirkung auf Th1-Zellen (Gold et al., 1994; Demeure et al., 1997). Auf Th2-Zellen sind sowohl unterstützende als auch suppressive Wirkungen beschrieben worden (Borger et al., 1998). Hilkens et al. (1995) wiesen nach, daß die Wirkung auf Th2-Zellen hierbei von der Anwesenheit von IL-2 abhängt: Bei fehlendem oder niedrigem IL-2, das für eine Th2-Differenzierung notwendig ist, wird auch die Aktivität von Th2-Zellen durch PGE₂ supprimiert, während die IL-4- und IL-5-Sekretion bei hohen IL-2-Mengen gefördert wird. Da in den durchgeführten Kokulturanalysen IL-2 immer nur in sehr geringen Mengen nachweisbar war, kann die Inhibierung des IL-4 auf PGE₂ zurückgeführt werden. Auch das von Synoviozyten gebildete TGF- β kann zur allgemeinen Inhibierung der Zytokinsekretion in T-Zellen beigetragen haben. Außerdem trat bei den *in vitro* generierten Th1- und Th2-Subpopulationen eine weitere Inhibierung der Zytokinsekretion von Th-Zellen durch direkten Zell-Kontakt auf. Bei den Kokulturen mit Th-Zellen aus arthritischen Tieren war dies allerdings nicht nachweisbar, hier deutete sich sogar wieder eine leichte Steigerung durch direkten Kontakt im Vergleich zu den nur über lösliche Faktoren inhibierten T-Zellen an. Im Vergleich zu Th-Monokulturen waren die sezernierten Zytokin-Mengen dennoch erheblich geringer.

Corrigal et al. (2000) konnten zeigen, daß Synoviozyten zur Anergie von T-Zellen führen können, weil ihnen der kostimulatorische Faktor CD80 auch nach Stimulierung mit IFN- γ auf der Zelloberfläche fehlt, während MHC II durch IFN- γ hochreguliert wird. Die Anergie wurde in ihren Versuchen sowohl in autologen als auch in allogenen humanen T-Zellen gegenüber Tuberkulin PPD induziert. Die T-Zellen reagierten darauf mit einer Hochregulierung von CD25 und einer fehlenden Antwort bei Restimulierung mit CD80⁺ professionellen APC. Für die Induktion einer solchen Anergie ist jedoch die Präsentation eines Antigens über MHC notwendig. Bei den hier durchgeführten Experimenten sind MHC II-Moleküle in der dritten Passage der Synoviozyten jedoch kaum noch nachweisbar und es wurde kein Antigen zugegeben, das bei Präsentation eine Bindung spezifischer

T-Zellen ermöglicht hätte. Außerdem wurde die kontaktabhängige Inhibierung bei *in vitro* generierten, polyklonal stimulierten T-Zellen nachgewiesen, die keine Antigen-Spezifität aufweisen. Dies bedeutet, daß hier Antigen-unabhängige Inhibierungsmechanismen stattfinden müssen. Eine andere Beobachtung spricht ebenfalls gegen eine spezifische Anergie-Induktion: Synoviozyten aus normalen und arthritischen Gelenken führten gleichermaßen zu einer Inhibierung der T-Zellaktivität.

Eine weitere Möglichkeit der Inhibierung besteht durch die Bindung von MHC I-Molekülen der Synoviozyten an Rezeptoren auf T-Zellen, die den KIR (killer-cell-inhibitor receptor) auf NK-Zellen entsprechen. Bei Bindung an diese Rezeptoren wird gewöhnlich ein negatives Signal an die Killer-Zelle gesendet, so daß es nicht zu einer Abtötung der Zielzelle kommt. Für das humane System konnten auf bestimmten CD4⁺ CD28⁻ T-Zell-Subpopulationen auch schon KIR nachgewiesen werden (Snyder et al., 2002). Diese Population wurde sogar vermehrt im rheumatoiden Gelenk gefunden (Warrington et al., 2001). In der Maus werden KIR jedoch nicht exprimiert. Andere Rezeptoren mit entsprechenden Funktionen in der Maus sind noch nicht bekannt, sind jedoch wahrscheinlich.

Diese Befunde könnten erklären, warum im arthritischen Gelenk zwar viele T-Zellen mit hochregulierten Aktivierungsmarkern auftreten, jedoch freigesetzte Th-Zytokine kaum nachweisbar sind (Dolhain et al., 1996; Maurice et al., 1997). Daß T-Zellen lokal im Gelenk einen ungewöhnlichen Phänotyp aufweisen, wird auch aus anderen Untersuchungen deutlich: Davis et al. (2001) konnten zeigen, daß aus dem Gelenk isolierte T-Zellen noch zur Zytokinsekretion fähig sind, jedoch die Fähigkeit zur Differenzierung zu Th2-Zellen stark herabgesetzt ist. Yamamura et al. (2001) weisen darauf hin, daß synoviale T-Zellen nur wenig CD25 exprimieren und nicht die typische „Blast-Form“ von aktivierten T-Zellen aufweisen. Brennan et al. (2002) gaben Hinweise darauf, daß die synovialen T-Zellen nicht die typischen T-Zell-Reaktivitäten zeigen, wie die über TCR-aktivierten T-Zellen, sondern sich eher wie T-Zellen verhalten, die durch einen Zytokincocktail aus IL-2 + TNF- α + IL-6 oder durch IL-15 aktiviert werden. Für die *In-vivo*-Vorgänge bei der RA ist die Stimulierung über IL-15 wahrscheinlicher, da IL-2 kaum, IL-15 dafür vermehrt im entzündeten Synovialgewebe nachweisbar ist und von den Synoviozyten gebildet wird (Harada et al., 1999).

Die Inhibierung der Zytokinsekretion erfolgte jedoch nur in T-Zellen, die zuvor *in vitro* stimuliert wurden. Wurden T-Zellen aus arthritischen oder gesunden Mäusen frisch isoliert, zeigten diese eine sehr geringe Zytokinfreisetzung, die durch Kontakt mit Synoviozyten schwach gesteigert wurde. Jedoch ist der Zytokin-Anstieg so gering, daß die Vermutung naheliegt, daß die Steigerung lediglich durch die verminderte Apoptose der T-Zellen zustande kommt. Zwar ist bekannt, daß Synoviozyten auch Antigen-präsentierende Funktionen haben können und als „Accessory“-Zellen fungieren können (Boots et al., 1994), da der Zytokinanstieg aber unabhängig davon auftrat, ob die Kokultur mit Synoviozyten aus arthritischen oder gesunden Gelenken durchgeführt wurde, ist eine solche Stimulierung in diesem System eher unwahrscheinlich.

Die nur sehr geringen Mengen an Th-Zytokinen in den Überständen aller Kokulturen sind ein weiteres Indiz dafür, daß lösliche Th-Zytokine bei der Stimulierung der Synoviozyten kaum eine Rolle spielen sondern membranständige Faktoren wesentlich wichtiger sind.

4.6 Die Rolle von TNF- α bei der Stimulierung von Synoviozyten

Da im humanen System die kontaktabhängige Stimulierung von MMP-1 und PGE₂ in Synoviozyten von membranständigem TNF- α auf T-Zellen abhängig sein soll (Burger et al., 1998), wurde untersucht, ob T-Zellen aus TNF- α -defizienten Mäusen zu einer geringeren Stimulierung der Synoviozyten führen.

TNF- α spielt in der RA eine wichtige Rolle, dies bezeugen gute Therapieerfolge mit TNF- α -blockierenden Antikörpern sowie Studien an TNF- α -transgenen Mäusen. Erste Untersuchungen an TNF- α -defizienten Mäusen am Institut für Pathologie zeigten, daß die AIA schwächer ausgeprägt und auch die Immunglobulin-Konzentrationen verringert ist. Die T-Zellen zeigten dabei eine starke Reaktivität, insbesondere das Th1/Th2-Gleichgewicht war noch stärker zu Th1-Zellen verschoben. Die Th-Zellen aus Milzen oder Lymphknoten arthritischer TNF- α -defizienter Mäuse sezernierten wesentlich höhere IFN- γ -Mengen als die aus arthritischen Wildtyp (WT)-Mäusen. Eine erhöhte IFN- γ -Sekretion von T-Zellen aus TNF- α -defizienten Mäusen wurde auch schon von Campbell et al. (2001) bei der CIA beschrieben.

Die frisch isolierten Th-Zellen aus Lymphknoten und Milzen arthritischer TNF- α -defizienter Mäuse (7d AIA) führten in der Kokultur zu einer geringeren MMP-Induktion im Vergleich zu den entsprechenden Th-Zellen aus WT-Mäusen. Bei den Th-Zellen aus den WT-Mäusen zeigte sich eine Abhängigkeit von membrangebundenen Faktoren, jedoch kaum bei den TNF- α -defizienten Th-Zellen. Daraus läßt sich schließen, daß die MMP-Induktion zu einem Teil über membranständigen TNF- α vermittelt wird. Untersuchungen von Chizzolini et al. (2000) lassen vermuten, daß an der MMP-Induktion noch weitere Faktoren beteiligt sind. Sie führten die MMP-1-Induktion in THP-1 Zellen (Monozyten) auch nur teilweise auf membranassoziierten TNF- α von Th1- und Th2-Zellen zurück. Ob in den Untersuchungen dieser Arbeit die höheren IFN- γ -Level von den Th-Zellen aus den TNF- α -defizienten Mäusen zur Verringerung der MMP-Induktion beigetragen haben, ist fraglich, da in den Modulationsversuchen extern zugeführtes IFN- γ zu den Kokulturen keine starke Veränderung der MMP-Aktivitäten in den Überständen erzielte.

Das IFN- γ führte wahrscheinlich zu den höheren NO- und IL-6-Konzentrationen in den Kokulturüberständen mit TNF- α -defizienten Th-Zellen. Daneben waren auch die IL-2-, PGE₂- und VCAM-1-Werte in den Kokulturen mit TNF- α -defizienten Th-Zellen höher.

Wie zuvor gezeigt wurde, hemmen unstimulierte Th-Zellen die PGE₂-Synthese in Synoviozyten. Dies trifft auch für Th-Zellen aus TNF- α -defizienten Mäusen zu, allerdings ist hierbei die Hemmung wesentlich geringer als mit Th-Zellen aus WT-Mäusen. Für membranständigen TNF- α sind bisher

jedoch nur PGE₂-stimulierende Wirkungen beschrieben (Burger et al., 1998) und auch in den Experimenten dieser Arbeit führte löslicher TNF- α zum PGE₂-Anstieg in SZ-Kulturen und Kokulturen. Aus diesem Grund hätte der Mangel an TNF- α zu einer noch stärkeren PGE₂-Hemmung in den Kokulturen mit TNF- α -defizienten Th-Zellen führen müssen. Da dies nicht der Fall war, ist zu vermuten, daß andere stimulierende Faktoren die Hemmung abschwächten. Als stimulierende Mediatoren kommen membranständiges IL-1 und IL-17 in Betracht. Ob IL-1 auf TNF- α -defizienten und normalen Th-Zellen unterschiedlich exprimiert wird, ist bislang unbekannt. IL-17 wurde aber in der Kokultur mit TNF- α -defizienten Th-Zellen aus Lymphknoten geringfügig mehr sezerniert. Andererseits wäre es auch möglich, daß die Th-Zellen aus den TNF- α -defizienten Mäusen geringere Mengen an PGE₂-inhibierende Mediatoren wie IL-13 und IFN- β freisetzen. Diese Zytokine wurden in den Kulturen jedoch nicht analysiert.

Möglicherweise ist die schwächere Inhibierung nur auf einen stärkeren Aktivierungszustand der Th-Zellen aus TNF- α -defizienten Mäusen zurückzuführen, denn wie zuvor in anderen Versuchen gezeigt, ist die Hemmung um so geringer, je stärker die Th-Zellen aktiviert sind. Die in der Kokultur sezernierten höheren IL-2-Mengen deuten auf eine stärkere Aktivität der TNF- α -defizienten Th-Zellen hin.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der TNF- α -Mangel in Th-Zellen nur zu einer etwas geringeren MMP-Stimulierung führte, alle anderen Synoviozyten-Reaktionen wurden nicht vermindert, sondern größtenteils noch verstärkt.

4.7 Die Rolle der Th-Subpopulationen

Im allgemeinen wird bei der RA eine Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichts hin zu Th1 beschrieben. Haddad et al. (1998) fanden im Blut von RA-Patienten ein höheres IL4/IFN- γ -Verhältnis, während im Synovium eine stärkere Th1-Prädominanz gefunden wurde (Quayle et al., 1993). Dieses deutet entweder auf eine differentielle Migration der T-Zellen in Abhängigkeit von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen hin (Astrup et al., 1997) oder auf eine Stimulierung im Gelenk, die eine lokale Differenzierung von Th1-Zellen ermöglicht. Eine Verschiebung des Gleichgewichtes zu Gunsten der Th1-Zellen wurde auch im AIA-Modell der Maus nachgewiesen (Simon, 2000). Untersuchungen an verschiedenen Mausstämmen zeigten, daß die Suszeptibilität für die AIA mit einer Th1-Polarisierung in den Mäusen zusammenhängt. Es ergab sich eine Korrelation zwischen der Schwere der Arthritis und der Stärke einer Th1-Antwort und der Produktion der entsprechenden Immunglobuline, die durch verschiedene Immunisierungsschemata induziert werden können (Simon, 2000). Dennoch ist im Gelenk das Th1-typische Zytokin IFN- γ , bezogen auf die Masse der infiltrierenden T-Zellen, äußerst gering exprimiert. Die funktionelle Rolle verschiedener Th-Subpopulationen bei der Entstehung und der Progression der Arthritis ist daher immer noch unklar. Es stellte sich daher die Frage, inwieweit eine Modulation der Th1/Th2-Balance das Geschehen in der

Arthritis beeinflussen kann. Aus diesem Grund wurde der Einfluß von Th1-Zellen im Vergleich zu Th2-Zellen auf Synoviozyten im Kokultursystem untersucht.

Die *in vitro* generierten Th-Subpopulationen wiesen starke Variationen in ihrem Zytokinprofil auf. Die Anzahl der IFN- γ^+ Zellen variierte in der Th2-Subpopulation noch zwischen 2 und 18 %. Eine mögliche Ursache für die Schwierigkeit, reproduzierbar reine Th2-Subpopulationen zu bekommen, könnte das im FCS enthaltene TGF- β darstellen. Lingua et al. (1998) zeigten, daß naive T-Zellen unter Einfluß von IL-4 und TGF- β beim Priming hohe IFN- γ -Level produzierten, bei TGF- β -Mangel jedoch nicht. Sie stellten die Hypothese eines alternativen Weges zur Th1-Differenzierung auf, nach der durch IL-4+TGF- β +IFN- γ Th1-Zellen geprimt werden. Allerdings haben sie in der so generierten T-Zellpopulation auch hohe IL-4-Mengen gemessen, so daß man hier nicht von einer reinen Th1-Zellpopulation sprechen kann. Durch Hemmung des endogenen IFN- γ konnte die Entwicklung dieser Th1-Zellen jedoch unterdrückt werden. Sollten die bei der vorliegenden Arbeit verwendeten *in vitro* generierten Th2-Zellen den dort beschriebenen T-Zellen entsprechen, so kann man auf eine ungenügende IFN- γ -Hemmung schließen, d.h. der eingesetzte Antikörper führte entweder nicht zu einer ausreichenden Neutralisierung oder die eingesetzten Dosen waren zu gering. Auch andere Zytokine waren in den verschiedenen Generierungsansätzen in leicht veränderten Verhältnissen nachweisbar. Openshaw et al. (1995) identifizierten Stimulierungsbedingungen und Kultivierungsdauer als kritische Parameter für die Heterogenität der Zytokinexpression bei *in vitro* generierten T-Zellen.

Aufgrund dieser Heterogenität waren auch große Unterschiede in den Kokulturen der Synoviozyten mit den verschiedenen Chargen der *in vitro* generierten Th1- und Th2-Zellen zu beobachten. Beide Th-Subpopulationen führten zu einer Stimulierung der Synoviozyten-Aktivität, jedoch mit unterschiedlichen Intensitäten in verschiedenen Versuchsansätzen. In 4 von 5 Experimenten führten Th2-Zellen zu einer stärkeren Stimulierung der MMP- und IL-6-Sekretion in Synoviozyten, während NO in allen Versuchen stärker durch Th1-Zellen induziert wurde. Die Stimulierung der Synoviozyten erfolgte in diesen Versuchen Antigen-unabhängig, weil zum einen Th-Zellen aus naiven Mäusen ohne Antigen-Spezifität eingesetzt wurden und zum anderen, weil Synovioyten aus arthritischen und normalen Gelenken gleichartig reagierten. Die wichtige Rolle von membranständigen Faktoren kam hier bei der MMP-Induktion deutlich zum Ausdruck. Neben den membranständigen Zytokinen IL-1 und TNF- α könnte bei Th2-Zellen auch membranständiges IL-4 zur Induktion der MMP beigetragen haben, wie es für die Induktion von MMP-1 in Monozyten beschrieben ist (Chizzolini et al., 2000). Lösliches IL-4 zeigte zumindest in reinen SZ-Kulturen eine schwache Stimulierung auf die MMP-3-Sekretion. Die schwächere Stimulierung der Synoviozyten durch Th1-Zellen könnte auch darauf zurückzuführen sein, daß sich in dieser Th-Subpopulation Tr1-Zellen befanden. Tr1-Zellen produzieren hauptsächlich IL-10, jedoch kein IL-4 und sollen regulatorische Funktionen ausüben können (Groux et al., 1997). Da in der FACS-Analyse auch relativ viele IL-10-Produzenten in der Th1-Subpopulation nachweisbar waren, könnten sich darunter solche Tr1-Zellen befunden haben.

Bei der TIMP-2-Stimulierung führte, im Vergleich zu löslichen Mediatoren von Th-Subpopulationen, nur der direkte Zellkontakt mit Th1-Zellen zu einer weiteren deutlichen Steigerung. Membranassoziierte Faktoren trugen weiterhin zur Stimulierung der IL-6- und NO-Sekretion bei, waren aber nicht unbedingt erforderlich, sondern konnten auch durch lösliche Faktoren ersetzt werden. Auch die Versuche von Burger und Dayer (2002) haben gezeigt, daß beide Th-Subpopulationen auf ihrer Zellmembran stimulierende Faktoren tragen, denn bei Isolation der Plasmamembranen verschiedener stimulierter Th-Zellklone führten sowohl Th1- als auch Th2-Zellen zur Stimulierung von Makrophagen.

Die Regulierung der Synoviozyten- und Th-Zellaktivität erfolgt nach diesen Befunden wie in Abb. 46 schematisch dargestellt.

Die *ex vivo* separierten Th-Subpopulationen, die aus immunisierten Mäusen gewonnen wurden und aufgrund des IFN- γ auf ihrer Zelloberfläche in die zwei Subpopulationen IFN- γ^+ und IFN- γ^- getrennt wurden, zeigten ein ähnliches Zytokinprofil wie die *in vitro* generierten Th-Subpopulationen. Auch hier wies die IFN- γ^- Population im Durchflußzytometer relativ viele IFN- γ^+ Zellen auf. In der Kokultur wurde von ihnen jedoch fast kein IFN- γ mehr gebildet, während die IFN- γ^+ Population viel IFN- γ bildete. Die IFN- γ^- Th-Zellen führten eindeutig zu einer stärkeren Stimulierung der Synoviozyten als die IFN- γ^+ Th-Zellen, erkennbar an der höheren Steigerung der IL-6- und MMP-Sekretion. IFN- γ^- Th-Zellen sezernierten außerdem IL-17, welches einen wesentlichen Beitrag an der IL-6- und MMP-Stimulierung geleistet haben könnte. Diese IL-17-Befunde bestätigen die im Durchflußzytometer nachgewiesene ausschließliche Sekretion des IL-17 von CD4⁺ T-Zellen, die kein IFN- γ bilden. Da IL-17 nur von Memory-T-Zellen (CD45RB^{low}) gebildet wird, bedeutet dies aber auch, daß durch die Separation Memory-Zellen in der IFN- γ^- Population angereichert wurden. Neueste Untersuchungen von Wu et al. (2002) haben gezeigt, daß IFN- γ^- Zellen auch aus einer *in vitro* oder *in vivo* generierten Th1-Zelllinie isoliert werden können. Diese zeichnen sich durch eine lange Überlebensdauer aus und sezernieren IFN- γ erst bei Restimulierung mit Antigen. In der hier isolierten IFN- γ^- Th-Population könnten sich daher auch viele solcher Th1-Memory-Zellen befunden haben, da durch die Immunisierung der Mäuse, aus denen diese Zellen gewonnen wurden, überwiegend Th1-Zellen generiert werden.

Für die Stimulierung der Synoviozyten müssen allerdings nicht unbedingt die Memory-Zellen die ausschlaggebenden Th-Zellen sein, denn auch die *in vitro* generierten Th-Zellen, die aus naiven Th-Zellen generiert wurden und nachweislich kein IL-17 bildeten, führten zu einer vergleichbaren Stimulierung. Eine direkte Stimulierung über Antigene ist ebenfalls unwahrscheinlich, da nicht nur Synoviozyten aus arthritischen Tieren, die noch immunogenes Antigen gebunden haben könnten, sondern auch Synoviozyten aus gesunden Mäusen gleiche Reaktionen zeigten.

Bei der Stimulierung durch IFN- γ^- Th-Zellen spielt der direkte Zellkontakt eine wesentliche Rolle, da mit Einsatz von Transwell-Membranen die IL-6- und MMP-Mengen drastisch abnahmen. Gleiches gilt für die Induktion von VCAM-1. Diese Abhängigkeiten von membranständigen Faktoren zeigen, daß

das lösliche IL-17 bei der Stimulierung der Synoviozyten entweder nur eine untergeordnete Rolle spielt oder daß es zusammen mit dem direkten Zellkontakt synergistisch wirkt. Eine synergistische Wirkung von IL-17 und ruhenden T-Zellen auf die Induktionen von IL-6, IL-8, MMP-3 und PGE₂ in humanen synovialen Fibroblasten wurde von Yamamura et al. (2001) ebenfalls nachgewiesen. Die Induktion von TIMP-1 durch IFN- γ Th-Zellen war vom Zellkontakt abhängig. TIMP-2 wurde durch IFN- γ Th-Zellen hingegen zellkontaktunabhängig stimuliert. Diese Beobachtungen glichen denen der *in vitro* generierten Th2-Zellen.

Weitere Unterschiede in den Kokulturen von Synoviozyten mit IFN- γ und IFN- γ ⁺ Th-Zellen zeigten sich in höheren IL-10- und IL-4- sowie niedrigeren IFN- γ - und NO-Spiegeln in den Überständen mit IFN- γ Th-Zellen. Dies spricht dafür, daß sich in der IFN- γ Th-Zellpopulation auch Th2-Zellen befanden. Die PGE₂-Konzentration war in den Kokulturüberständen mit IFN- γ Zellen geringfügig höher als mit IFN- γ ⁺ Th-Zellen, die VCAM-1-Expression wurde von beiden Th-Subpopulationen jedoch gleichermaßen gesteigert.

Diese Ergebnisse sprechen gegen die Hypothese, daß die Arthritis durch eine stärkere Stimulierung der Synoviozyten durch Th1-Zellen unterhalten wird. Im Gegenteil, es scheint, daß bei Kokultur mit Th1-Zellen oder IFN- γ ⁺ Th-Zellen die gegenregulatorische Funktion des IFN- γ in den Vordergrund rückt und zu einer geringeren MMP-Induktion geführt haben könnte. Sowohl die *in vitro* generierten Th2-Zellen als auch die IFN- γ Th-Zellen wirkten stärker stimulierend auf IL-6, MMP und TIMP. Für die Induktion der IL-6- und MMP-Expression sind hierbei im wesentlichen Moleküle auf der Zelloberfläche verantwortlich. Um welche Moleküle es sich dabei handelt, kann bisher nur vermutet werden. Membrangebundenes IL-4 stellt eine Möglichkeit dar, in wieweit TNF- α und IL-1 β , die ebenfalls an der Induktion von MMP beitragen können, auf Th1- und Th2-Zellen unterschiedlich exprimiert werden, ist bisher unbekannt. Die Th2-Zellen führten jedenfalls zu einer stärkeren Verschiebung des Gleichgewichts von MMP/TIMP hin zu MMP. Ein weiterer Anhaltspunkt dafür, daß IFN- γ Th-Zellen stärker stimulierend wirken können als IFN- γ ⁺ Th-Zellen, lieferten Ergebnisse von Transferversuchen mit IFN- γ und IFN- γ ⁺ T-Zellen, die ebenfalls aus immunisierten C57BL/6-Mäusen anhand von CD4 und IFN- γ auf der Zelloberfläche isoliert wurden. Nach Transfer in normale Mäuse und Injektion des Antigens ins Kniegelenk führten die IFN- γ Th-Zellen in den Rezipienten zu signifikant stärkeren Gelenkschwellungen und histologischen Veränderungen als die IFN- γ ⁺ Th-Zellen (Simon, 2000). Im Serum der Rezipienten waren 18 Tage nach dem Transfer der IFN- γ Th-Zellen signifikant höhere IFN- γ -Spiegel gefunden worden. Diese Beobachtung spricht ebenfalls dafür, daß in dieser Population viele IFN- γ Th1-Memory-Zellen vorlagen, wie sie von Wu et al. (2002) charakterisiert wurden. Diese Autoren wiesen nach, daß diese Zellen *in vivo* eine viel längere Lebensdauer aufweisen als aktive IFN- γ ⁺ Th-Zellen, die relativ schnell *in vivo* eliminiert werden. Dies könnte auch eine Ursache dafür gewesen sein, daß es nach Transfer der IFN- γ ⁺ Th-Zellen zu einer schwächeren Ausprägung der Arthritis kam.

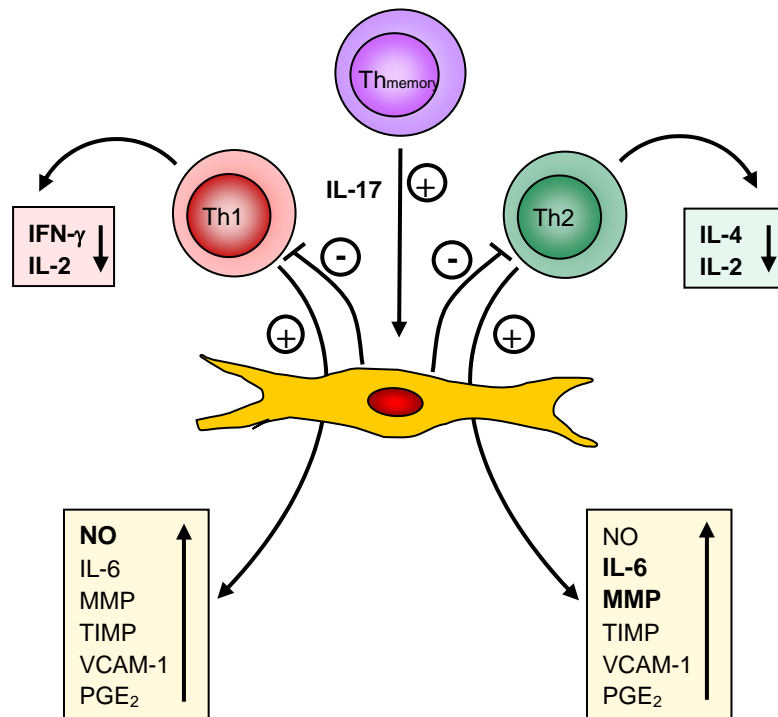


Abb. 46: Schematische Darstellung der Regulation der Synoviozyten- und Th-Zellaktivität

Aktivierte Th1-Zellen und Th2-Zellen stimulieren Synoviozyten zur Sekretion von NO, IL-6, PGE₂, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 und -2 und zur erhöhten Expression von VCAM-1 auf der Zelloberfläche. Die Intensität der Stimulierung hängt von der Th-Subpopulation ab. Th1-Zellen führen zu einer stärkeren NO-Induktion, während Th2-Zellen die IL-6- und MMP-Sekretion stärker stimulieren. Beide Th-Subpopulationen werden in der Sekretion ihrer Th-Zytokine durch Synoviozyten stark gehemmt. IFN- γ Th-Zellen aus immunisierten Mäusen enthalten reichlich IL-17-produzierende Memory-Th-Zellen, die auf Synoviozyten besonders stark stimulierend wirken.

4.8 Modulation der zellulären Interaktionen durch TNF- α und TGF- β

Um das entsprechende Zytokinmilieu, das in der synovialen Flüssigkeit vorliegt, in der Kokultur nachzuahmen, wurden den Kulturen definierte Mengen löslichen TNF- α und/oder TGF- β 1 zugegeben. TNF- α stellt hierbei das proinflammatorische Agens dar, das die Synoviozyten stimulieren soll, während TGF- β 1 mit seinen antiinflammatorischen Eigenschaften im Verdacht steht, regulierend eingreifen zu können (Feldmann et al., 1996).

TNF- α führte wie erwartet zur Steigerung von NO, IL-6 und VCAM-1 sowie geringfügig auch von PGE₂. Es zeigte synergistische Wirkungen mit T-Zellen auf die Stimulierung von IL-6, NO und PGE₂. Die Zymogramme bestätigten eine Stimulierung der MMP-9- und -3-Sekretion, während TIMP-2 kaum hochreguliert wurde. Dies äußerte sich in einer starken Zunahme der Aktivität gegenüber den synthetischen MMP-Substraten Peptid 1 und Peptid 2.

Auch TGF- β 1 führte zu einer Steigerung von IL-6, PGE₂ und MMP-9, wobei die erhöhten Werte z.T. auch auf eine gesteigerte Proliferation der Synoviozyten zurückzuführen waren, da die Zellzahl nach der Kultur mit TGF- β 1 stark zugenommen hatte. Synergistische Wirkung mit TNF- α und Th-Zellen zeigte TGF- β 1 hauptsächlich auf die Stimulation von PGE₂.

Obwohl für TGF- β 1 überwiegend suppressive Effekte auf die MMP-Produktion beschrieben sind, gibt es auch Hinweise auf MMP-fördernde Reaktionen. Borden und Heller (1997) publizierten, daß TGF- β MMP-9 zu induzieren vermag. In den Untersuchungen dieser Arbeit war aus den Zymogrammen eine MMP-9-Induktion durch TGF- β 1 eindeutig erkennbar. MMP-3 wurde dagegen in 2 von 5 Kulturansätzen durch TGF- β 1 schwach inhibiert. Die TIMP-2-Bande im reversen Zymogramm war nach Kultur mit TGF- β 1 in allen Ansätzen verstärkt. Die Netto-Aktivität der MMP in den Kulturüberständen, gemessenen mit den Fluoreszenzpeptiden, war nur geringfügig verändert. Für die MMP-3-Aktivität gegenüber Peptid 2 war ein leichter Rückgang der Aktivität nachweisbar, während die Aktivität gegenüber Peptid 1, das von Gelatinasen stärker abgebaut wird als von Stromelysinen und Kollagenasen, leicht erhöht war. Diese Veränderungen durch TGF- β 1 kamen in den Kokulturen und in den mit TNF- α -stimulierten Ansätzen wesentlich stärker zum Ausdruck als in den reinen unstimulierten Synoviozytenkulturen. Hier wurde ersichtlich, daß TGF- β 1 die TNF- α -induzierte MMP-9-Sekretion sowohl in der Kokultur als auch in der reinen Synoviozytenkultur verstärkte, während es der Induktion der MMP-3-Aktivität entgegenwirkte. Diese differentielle Regulierung der MMP-Aktivitäten durch TGF- β 1 kann für die Vorgänge im Gelenk von Bedeutung sein, da man davon ausgeht, daß besonders die MMP-3 im Degradations- und Aktivierungsprozeß eine große Rolle spielt.

Entgegengesetzte Funktionen von TGF- β 1 und TNF- α zeigten sich auch in der Regulierung der NO- und VCAM-1-Synthese. TNF- α induzierte NO, welches in allen Kulturen durch TGF- β 1 fast vollständig gehemmt wurde. Auch VCAM-1 wurde durch TNF- α stimuliert. Bei TGF- β 1-Zugabe nahm die Zellzahl in der Kultur erheblich zu, dennoch nahm das VCAM-1-Signal durch TGF- β 1 ab, d.h. auch hier übte es eine starke Hemmung aus.

Auf die Sekretion der Zytokine von Th-Zellen wirkte TGF- β 1 stark inhibierend, was seiner anti-inflammatorischen Eigenschaft und/oder seiner suppressiven Wirkung auf die T-Zellproliferation zuzuschreiben ist. In der Kokultur kam der Einfluß des TGF- β 1 und ebenso des TNF- α kaum noch zum tragen, da die sezernierten Zytokinmengen sehr gering waren.

Diese Ergebnisse zeigen, daß TGF- β 1 auf Synoviozyten vorwiegend stimulatorisch wirkt und die bei der Th-Zell-Synoviozyten-Interaktion induzierte IL-6-, PGE₂- und MMP-Sekretion verstärkt. McInnes et al. (2000) wiesen ebenfalls darauf hin, daß TGF- β die Synoviozyten-Reaktion in Kokulturen verstärken kann. Aus diesem Grund wäre kaum eine Abschwächung der pathologischen Prozesse im arthritischen Gelenk zu erwarten. Die in RA-Patienten nachgewiesenen erhöhten TGF- β -Spiegel in der Synovialflüssigkeit sprechen ebenfalls eher für eine krankheitsfördernde Wirkung, denn die höhere Proliferationsrate in der synovialen Deckzellschicht und die daraus resultierende Hyperplasie sowie die zunehmenden Fibrosierung (Douthwaite et al., 1999) wird mit TGF- β in Zusammenhang gebracht. Sogar Aggrecanase-induzierende Effekte sind für TGF- β nachgewiesen worden (Yamanishi et al., 2002). TGF- β 1 erscheint demnach kein geeigneter therapeutischer Ansatz. Dennoch war die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in DBA/1 Mäusen durch tägliche Gaben von TGF- β 1 vor Ausbruch der

Arthritis unterdrückbar (Kuruvilla et al., 1991). Die protektive Wirkung des TGF- β 1 in diesem Modell läßt sich über eine verminderte Induktion der costimulatorischen Funktion von dendritischen Zellen durch Suppression der T-Zellfunktionen erklären (Summers et al., 1999). Ein therapeutischer Effekt auf die etablierte Arthritis konnte durch TGF- β 1 bei der CIA jedoch nicht erzielt werden (Kuruvilla et al. 1991).

In weiteren Untersuchungen sollte deshalb geprüft werden, ob andere Zytokine die Aktivität der Synoviozyten in der Kokultur effektiver modulieren können.

4.9 Modulation der zellulären Interaktionen mit löslichem IFN- γ , einem Th1-Zytokin

Da die Freisetzung der Th-Zytokine IFN- γ und IL-4 im Gelenk wie auch in der Kokultur unterdrückt wird, wurden diese Zytokine der Kokultur zugefügt, um zu beurteilen, ob eine Modulation der Synoviozytenreaktion mit diesen Zytokinen erreicht werden kann.

IFN- γ konnte bei keinem der gemessenen Parameter zu einer deutlichen Hemmung der Synoviozytenaktivität in den Kokulturen führen. Auch die Induktion der MMP-Gesamtaktivität wurde nur geringfügig vermindert. In TNF- α -stimulierten Synoviozyten bewirkte IFN- γ aber eine starke Verminderung der MMP, wie es auch von anderen Autoren nachgewiesen wurde (Alvaro-Gracia et al., 1990). Das läßt vermuten, daß die MMP-Expression in der Kokultur nicht allein durch TNF- α induziert wurde. Auch die Studien mit Th-Zellen aus TNF- α -defizienten Mäusen wiesen ja schon darauf hin, daß TNF- α nicht allein für die Induktion verantwortlich sein kann. Denkbar ist ein weiterer Aktivierungsmechanismus über IL-1, der durch IFN- γ nicht inhibierbar ist, denn bei Stimulierung der Synoviozyten mit löslichem IL-1 β führte IFN- γ zu keiner Inhibierung der MMP-Aktivität. Die Induktion von NO und IL-6 in der Kokultur wurde durch IFN- γ -Zusatz verstärkt.

Die Ergebnisse liefern keine klaren Hinweise dafür, daß der Zusatz von IFN- γ die Synoviozyten-Reaktionen bei zellulären Interaktionen hemmen könnte. In einigen *In-vivo*-Modellen konnte für IFN- γ eine protektive Wirkung nachgewiesen werden (Nakajima et al., 1990; Vermeire et al., 1997; Matthys et al., 1998). Allerdings werden in der Literatur sehr widersprüchliche Effekte von IFN- γ dargestellt (Cooper et al., 1988; Mauritz et al., 1988; Boissier et al., 1995; Lifke et al., 1999; Matthys et al., 2001a). Die protektive Wirkung ist vermutlich weniger auf die Modulation der Wechselwirkungen zwischen Th-Zellen und Synoviozyten zurückzuführen, sondern eher auf andere Mechanismen. IFN- γ könnte z.B. über die Unterdrückung der Haemopoese und der Expansion von Mac-1⁺ Zellen (Matthys et al., 1999), die durch Immunisierung mit komplettem Freund'schen Adjuvans ausgelöst wird (Matthys et al., 2001a), oder über die Abschwächung der chemotaktischen Reaktionen von Makrophagen wirken. Aus Untersuchungen mit IFN- γ -defizienten Mäusen läßt sich auch auf eine Inhibierung der IL-1-Produktion durch IFN- γ zurückschließen (Guedez et al., 2001).

Bei Immunisierung mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans (IFA) zur Induktion der CIA führte IFN- γ hingegen zu einer Verstärkung der Arthritis, die mit einer geringeren Myelopoese einherging

(Matthys et al., 1999). Hier treten möglicherweise Funktionen wie Verstärkung der Zellaktivität und der Antigen-spezifischen Antwort von T- und B-Zellen in den Vordergrund. Die Wirkung von IFN- γ hängt also von einer ganzen Reihe anderer Faktoren ab, so daß in verschiedenen Krankheitsphasen, in unterschiedlichen Modellen und in verschiedenen Stämmen sehr unterschiedliche Auswirkungen zu beobachten sind.

4.10 Modulation der zellulären Interaktionen mit löslichem IL-4 , einem Th2-Zytokin

Im Gegensatz zu IFN- γ führte IL-4 in der Kokultur zu einer deutlichen Senkung der MMP-Gesamtaktivität, hatte aber auf IL-6 und PGE₂ eine stimulierende Wirkung. Eine Verschiebung von Th1- zu Th2-Zellen war dabei nicht zu beobachten, da IL-4 nicht nur die IFN- γ -Produktion senkte, sondern gleichzeitig auch die IL-5- und IL-6-Synthese in Th-Zellen hemmte. Die Rolle von IL-4 im Gesamtprozeß der RA weist noch viele Unklarheiten auf. Yoshino et al.(1998) fanden bei der AIA in DBA/1J Mäusen eine Verringerung der Knochenresorption durch IL-4. Joosten et al. (1999) konnten bei der CIA eine verminderte Knorpelzerstörung durch systemische Gabe von IL-4 und Lubberts et al. (2000) darüber hinaus eine verminderte Knochenresorption durch adenovirale Transfektion von IL-4 beobachten. Die MMP- und IL-5-Abnahme in den Kokulturen könnte diesen Effekt erklären, da MMP zur Knorpel- und Knochenresorption beitragen und IL-5 die für die Knochenresorption verantwortlichen Osteoklasten zur Differenzierung anregen kann (Toyosaki-Maeda et al., 2001). Lubberts et al. (2000) wiesen bei Überexpression von IL-4 eine gleichzeitige Suppression von IL-17, IL-12 und IL-6 nach. Des weiteren sind für IL-4 hemmende Effekte auf NO, IL-1, TNF und IL-8 beschrieben. Eine Inhibierung der NO- oder IL-6-Synthese in der Kokultur konnte in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden. Eine hemmende Funktion auf IL-6 war allein in T-Zellen zu beobachten, jedoch nicht in Synoviozyten.

In reinen Synoviozyten-Kulturen wurde mit IL-4 ein Anstieg der MMP-3-Aktivität im Fluoreszenz-assay mit Peptid 2 erreicht, während die Aktivität gegenüber Peptid 1 leicht gehemmt wurde. Eine solche differentielle Regulierung von MMP durch IL-4 wurde auch schon für humane Monozyten beschrieben (Corrigall et al., 2000). Hier führte IL-4 zur Senkung der MMP-9 und zur Steigerung der MMP-3. Zenmyo et al. (1996) wiesen für IL-4 auch eine MMP-1-stimulierende Wirkung auf synoviale Fibroblasten *in vitro* nach. Auf der anderen Seite zeigten Borghaei et al. (1998), daß IL-4 die IL-1-induzierte MMP-1-, MMP-3- und PGE-Synthese in synovialen Fibroblasten inhibieren kann. In den Kokulturen war mit IL-4 eine Inhibierung der MMP-Gesamtaktivität gegenüber beiden Substraten erreichbar, d.h. auch eine Inhibierung der MMP-3-Aktivität, nicht jedoch in unstimulierten reinen Synoviozyten-Kulturen. Es ist deshalb denkbar, daß die Synoviozyten über membrangebundenes IL-1 auf den Th-Zellen zur MMP-Produktion stimuliert werden, welches durch IL-4 inhibiert werden könnte.

In der Literatur finden sich mehrere Hinweise, daß IL-4 insgesamt eher fördernde, statt hemmende Einflüsse auf die Arthritis ausübt. Jacobs et al. (1994) konnten mit IL-4 Exazerbationen in Mäusen mit

AIA hervorrufen. In unserer Arbeitsgruppe konnte in IL-4-defizienten Mäusen nur eine abgeschwächte Arthritis induziert werden. Eine gestörte Reifung von dendritischen Zellen, die IL-4 abhängig ist, könnte eine Ursache hierfür sein (Lutz et al., 2002). IL-4 kann außerdem zelluläre Antworten unterstützen. So fördert IL-4 in Balb/c-Mäusen allein und in C57BL/6-Mäusen in Kombination mit TNF- α eine starke DTH-Reaktion. Auch im SCID-Maus-Modell wird nach Transfer von IL-4-transfizierten Synoviozyten eine verstärkte Arthritis gefunden (U. Sack, persönliche Mitteilung). Bei der CIA treten in IL-4-defizienten Mäusen schwächere akute Reaktionen auf, die mit einer verminderten B- und T-Zellantwort verbunden sind, während sich die chronische Phase stärker entwickelte (Svensson et al., 2002). Diese Befunde sprechen für eine entzündungsfördernde Wirkung von IL-4 in der initialen Phase der Krankheit, während es in der chronischen Phase durch Hemmung der MMP-Expression die Destruktionen vermindern kann. Bestätigt wird dies durch Experimente von Joosten et al. (1999), wo systemische IL-4-Gaben bei der CIA zur verminderten Knorpelzerstörung führten, während es auf die Entzündung nur einen moderaten Effekt zeigte. Die positive Wirkung von IL-4 in der chronischen Phase wie auch die von IFN- γ im CIA-Modell könnte in beiden Fällen auf eine reduzierte IL-1-Aktivität zurückzuführen sein, denn in IFN- γ -defizienten Mäusen wurde eine erhöhte IL-1-Produktion nachgewiesen und die Gabe von IL-4 führte zum Anstieg von IL-1RA.

Eine suppressive Wirkung von IL-4 bereits bei Induktion der Arthritis konnte bei der Proteoglykan-induzierten Arthritis (PGIA) (Finnegan et al., 1999) und der Adjuvans-Arthritis (AA) (Yoshino et al., 1998) nachgewiesen werden. In IL-4-defizienten Mäusen kam es bei der PGIA zu einer stärkeren Ausprägung der Arthritis, die auch mit einem erhöhten IgG2a-Spiegel korrelierte (Kaplan et al., 2002). Auch IFN- γ spielt bei der PGIA in der initialen Phase eine andere Rolle als bei der CIA: Die Inzidenz und Schwere der Arthritis in IFN- γ -defizienten Mäusen war bei der PGIA wesentlich geringer, während sie bei der CIA verstärkt war. Diese widersprüchlichen Befunde könnten damit zusammenhängen, daß die Induktion der pathologischen Prozesse bei der CIA stärker über Antikörper vermittelt wird, während sie bei der PGIA und der AA mehr über T-Zell-Mechanismen stattfindet. Wie bei IFN- γ hängt die Wirkung des IL-4 daher auch von den immunologischen Ausgangsbedingungen ab. Zusammengefaßt könnte IL-4 bei Arthritiden einer Knorpel- und Knochenzerstörung entgegenwirken, die Entzündungsprozesse hingegen eher fördern.

4.11 Schlußfolgerungen

Bei den Interaktionen von Synoviozyten mit Th-Zellen werden die Synoviozyten stark aktiviert. Gleichzeitig kommt es dabei zu einer Inhibierung der Zytokinsekretion in stimulierten Th-Zellen. Diese Verminderung der Zytokinsekretion könnte eine Ursache dafür sein, daß im RA-Gewebe zwar zahlreiche T-Zellen mit Aktivierungsmarkern vorhanden sind, jedoch nur wenig sezernierte T-Zell-Zytokine nachgewiesen werden. Dies läßt vermuten, daß die Th-Zellen ihre Funktion nur im geringen Maße über lösliche Zytokine vermitteln und die hauptsächlichlichen Wirkmechanismen über direkten Zellkontakt stattfinden. Für die Interaktion von T-Zellen mit Makrophagen ist die große Bedeutung des direkten Kontaktes bereits durch viele Untersuchungen belegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß auch der direkte Kontakt zwischen T-Zellen und Synoviozyten maßgeblich zur Aktivierung der Synoviozyten beiträgt und im Falle der MMP-Induktion durch Th1-Zellen sogar notwendig ist.

Die ursprüngliche Hypothese, daß Th1-Zellen zu einer stärkeren Aktivierung der Synoviozyten führen, konnte allerdings nicht bestätigt werden, im Gegenteil, die Th2-Zellen wiesen meistens sogar ein stärkeres Aktivierungspotential auf. Auch die Modulation der Interaktionen mit dem Th1-Zytokin IFN- γ oder dem Th2-Zytokin IL-4 ergaben nur geringe Änderungen in der Synoviozyten-Aktivität. Selbst TGF- β 1, welches sowohl Th1- als auch Th2-Reaktionen supprimiert, konnte lediglich die Sekretion von NO und MMP-3 senken, während es die von IL-6, MMP-9 und PGE₂ sogar noch steigerte. Eine erfolversprechende Therapie mit löslichen Mediatoren zur Modulation der Interaktionen von Th-Zellen mit Synoviozyten ist mit diesen Zytokinen daher nicht zu erwarten.

Auch *In-vivo*-Untersuchungen mit Zytokin-defizienten Mäusen oder Transferexperimente von isolierten Th-Subpopulationen lassen nicht unbedingt auf eine stärkere arthritogene Wirkung von Th1-Zellen oder deren Zytokine schließen. Die Rolle von IFN- γ in der Pathogenese äußerte sich in verschiedenen Modellen und zu verschiedenen Zeitpunkten der Arthritis sehr unterschiedlich. *In vivo* hängen die Wirkungen von IFN- γ und IL-4 offensichtlich von sehr vielen Faktoren ab. Deutlich wird dies beim Vergleich von Arthritis-Modellen, in denen mit oder ohne Mykobakterien-Zusatz immunisiert wird. Dabei führen die Mykobakterien im CFA zu einer stärkeren Aktivierung von Th1-Zellen und zur vermehrten Entwicklung von Mac-1⁺ myeloiden Zellen (Billiau und Matthys, 2001). Diese veränderten Voraussetzungen für das Immunsystem im Vergleich zur Immunisierung mit IFA haben einen wesentlichen Einfluß auf die weiteren Prozesse. Dadurch wird z.B. die CIA, mit IFA oder CFA ausgelöst, durch unterschiedliche immunologische Vorgänge angetrieben und ist auch unterschiedlich beeinflussbar. Für die AIA wurde hier ebenfalls CFA verwendet, wodurch die Vermutung nahe liegt, daß die Effekte von IL-4 und IFN- γ im AIA-Model denen bei der CIA mit CFA relativ ähnlich sind. Erste Untersuchungen an IFN- γ -defizienten Mäusen weisen auf eine protektive Wirkung von IFN- γ hin. Zudem haben Studien an verschiedenen Mausstämmen gezeigt, daß IFN- γ nicht ausschließlich für die Induktion der Arthritis verantwortlich sein kann, da auch im nicht-suszeptiblen Stamm CBA/J sehr hohe IFN- γ -Level gefunden wurden (Simon, 2000). Dennoch ist die Antigen-induzierte Arthritis in CFA-immunisierten Mäusen, die eine stärkere Th1-Antwort zeigten, wesentlich ausgeprägter als in Alum-immunisierten AIA-Mäusen, die eine stärkere Th2-Polarisation

zeigten. Immunglobulin-Analysen zeigten aber auch, daß die schwächere Arthritis nicht nur mit einer verminderten IgG2a-Produktion einhergeht, sondern auch mit einer niedrigeren IgG1-Produktion, die gewöhnlich durch IL-4 induziert wird (Simon, 2000). Dies bedeutet, daß die humoralen Immunantworten in solchen Modellen ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Es ist daher zu vermuten, daß Th1-Zellen die Entstehung der Arthritis unterstützen, daß aber die Schwere der Arthritis nicht nur durch eine einfache Th1-Aktivierung erklärbar ist. Die Beteiligung der Th1-Zellen muß daher in einem größeren Kontext gesehen werden, der andere, damit zusammenhängende Immunprozesse mit einbezieht.

Weiterhin ist zu bedenken, daß die IFN- γ -induzierten Immunreaktionen auch über andere Zellen, wie z.B. NK-Zellen vermittelt werden können. Den NK-Zellen wird in der RA ebenfalls eine wichtige Rolle zugesprochen. Dalbeth et al. (2002) fanden in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten einen Subtyp von NK-Zellen angereichert, der auf Monokine sensitiver mit IFN- γ -Sekretion reagiert als CD3⁺ T-Zellen. Das von NK-Zellen produzierte IFN- γ könnte relevant werden, wenn man Th1-unabhängige Mechanismen in Betracht zieht, da mit IFN- γ geprimte Makrophagen auch durch direkten Kontakt mit Th2-Zellen aktiviert werden können (Stout und Suttles, 1993). Darüber hinaus zeigen Transferexperimente von Synoviozyten in SCID-Mäuse, daß es auch Induktionsmechanismen gibt, die ganz unabhängig von T-Zellen stattfinden können. Eine Erklärung hierfür wäre, daß die starken Entzündungsvorgänge, bei denen es zur permanenten Stimulation der beteiligten Zellen kommt, zu Veränderungen des Phänotyps der Zellen führen, so daß sich der Prozeß verselbständigt und Aktivierungsvorgänge dann auch T-Zell-unabhängig ablaufen können.

Dennoch kommt den Th-Zellen bei der Arthritis eine Schlüsselrolle zu. Dies bezeugen Untersuchungen an Mäusen mit AIA, in denen Th-Zellen durch anti-CD4-Antikörper depletiert wurden. Die Depletion resultierte in einer verminderten Arthritis verbunden mit einer geringeren Makrophagenaktivität und niedrigeren Immunglobulin-Level (Nissler, 1999, Nissler et al., submitted, Pohlers et al., submitted). Wahrscheinlich spielen Th-Zellen und IFN- γ besonders in der initialen Phase der AIA eine wichtige Rolle, um die Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen mit entsprechender Immunglobulin-Produktion in Gang zu setzen. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, daß Th-Zellen darüber hinaus auch Synoviozyten stark stimulieren. Die Intensität der Aktivierung von Synoviozyten hängt vom Aktivierungszustand der Th-Zellen und weniger von der Subpopulation ab und ist durch die löslichen Th-Zytokine IFN- γ und IL-4 nur gering beeinflussbar. Memory-Zellen und das von ihnen sezernierte IL-17 haben eine besonders starke Potenz, Synoviozyten zu aktivieren. Da sowohl die Stimulation von Makrophagen als auch von Synoviozyten überwiegend über membranständige Mediatoren vermittelt wird, sollte eine effektive Therapie durch Unterbindung dieser Interaktionen oder durch Verhinderung der Einwanderung der Th-Zellen in die Gelenke möglich sein. Über welche Mechanismen diese Interaktionen stattfinden, sollte daher ein wichtiges Ziel in der weiteren Forschung darstellen. Eine Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes hingegen läßt nach diesen Befunden keine Supprimierung der Synoviozytenaktivität und der damit verbundenen pathologischen Prozesse in der Arthritis erwarten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Rheumatoiden Arthritis führen chronische Entzündungsprozesse zur Schädigung der Gelenkstrukturen. Immunzellen infiltrieren das Synovialgewebe und stimulieren Zellen lokal, die mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Matrix-degradierenden Enzymen reagieren. An diesen Prozessen sind Th-Zellen und Synoviozyten maßgeblich beteiligt. Die Aufklärung der an den Interaktionen beteiligten Mechanismen soll helfen, neue Therapieansätze zu finden. Aus diesem Grunde wurden die Interaktionen von Th-Zellen und ihren Subpopulationen mit Synoviozyten sowie deren Modulierbarkeit in einem Kokultursystem *in vitro* untersucht. Dazu wurden Zellen aus C57BL/6-Mäusen mit Antigen-induzierter Arthritis eingesetzt.

Zunächst wurde der direkte Einfluß der Th-Zytokine IL-2, IFN- γ (Th1-Zytokine), IL-4 und IL-10 (Th2-Zytokine) sowie IL-17 (Memory-T-Zellen) auf Synoviozyten untersucht. Synoviozyten aus arthritischen und gesunden Gelenken verhielten sich prinzipiell gleich. IL-17 führte zu einer starken, den Monokinen IL-1 β und TNF- α vergleichbaren Stimulierung der Synoviozyten, wobei es die Produktion von IL-6, NO, PGE₂, MMP-9 und MMP-3 verstärkte. IL-10 und IL-4 stimulierten die TIMP-2-Sekretion und IL-10 in geringem Maße auch die IL-6-Sekretion. IFN- γ führte zu einer Steigerung der NO- und IL-6-Freisetzung sowie zu einer Verstärkung der VCAM-1-Expression, beeinflusste die MMP-Aktivitäten aber kaum. Bei stimulierten Synoviozyten führte IFN- γ hingegen zur Herabsetzung der LPS- oder TNF- α -induzierten MMP-Sekretion, beeinflusste jedoch nicht die IL-1 β -induzierte MMP-Sekretion. Somit kann dem IFN- γ neben seiner proinflammatorischen Eigenschaft auch eine protektive Wirkung bei proteolytischen Knorpeldestruktionen zugeschrieben werden, wenn die Stimulierung über TNF- α vermittelt wird.

Weiterhin wurde der Einfluß von CD4⁺ Th-Zellen auf Synoviozyten bei direktem Zellkontakt untersucht. Dazu wurden CD4⁺ Th-Zellen aus Milzen und Lymphknoten arthritischer Mäuse isoliert und im Vergleich zu CD4⁻ mononukleären Zellen mit Synoviozyten kokultiviert. Die CD4⁺ T-Zellen bewirkten eine stärkere Induktion von NO, IL-6 und MMP, aber auch von TIMP als CD4⁻ Zellen. Die Stärke der Stimulierung der Synoviozyten hing vom Aktivierungszustand der Th-Zellen ab. Th-Zellen aus arthritischen Tieren führten zu einer höheren NO-, IL-6- und MMP-Sekretion, während Th-Zellen aus gesunden Mäusen TIMP-2 stärker stimulierten und PGE₂ stärker supprimierten. Versuche mit Membraneinsätzen zur Unterbindung des direkten Zellkontaktes zwischen Th-Zellen und Synoviozyten zeigten, daß membranständige Faktoren eine wesentliche Rolle spielen. Die Apoptoserate von Synoviozyten wie auch von T-Zellen wurde durch die Kokultur erheblich verringert. Synoviozyten aus gesunden oder arthritischen Gelenken reagierten auf die Stimuli jeweils in gleicher Weise, so daß Antigen-spezifische Aktivierungsmechanismen ausgeschlossen werden können.

Da die Rheumatoide Arthritis mit einer stärkeren Th1-Antwort verbunden ist, wurde als nächstes geprüft, ob Th1-Zellen im Gegensatz zu Th2-Zellen zu einer stärkeren Aktivierung der Synoviozyten führen. Dafür wurden zum einen CD4⁺ Th-Zellen aus immunisierten Tieren anhand ihres membranständigen IFN- γ in IFN- γ ⁺ und IFN- γ ⁻ Th-Zellen getrennt und separat mit Synoviozyten kokultiviert,

zum anderen wurden *in vitro* generierte Th1- und Th2-Zellen verwendet. Die Generierungsansätze führten allerdings zu relativ uneinheitlichen Th-Subpopulationen, so daß deren Effekte auf Synoviozyten stark schwankten. Meist zeigten die Th2-Zellen aber ein ähnliches oder sogar stärkeres Potential, Synoviozyten zu aktivieren. Bei den *ex vivo* separierten Th-Zellen führten in jedem Fall die IFN- γ Th-Zellen zu einer höheren IL-6- und MMP-Sekretion als IFN- γ ⁺ Th-Zellen. Da die IFN- γ Th-Zellen vermehrt IL-17 bildeten, könnte dieses Zytokin neben dem direkten Zellkontakt zur Steigerung der Synoviozytenaktivität beitragen. Ein stärkeres Aktivierungspotential konnte der Th1-Subpopulation demnach nicht zugeordnet werden.

Die Zytokinsekretion von stimulierten Th-Zellen wurde durch Kontakt mit Synoviozyten gehemmt. Dies betrifft sowohl IL-4 von Th2-Zellen als auch IFN- γ von Th1-Zellen. IL-2 wurde in beiden Fällen nur gering sezerniert. Die inhibierende Wirkung von Synoviozyten auf Th-Zellen könnte ein Grund dafür sein, daß die in den Zellinfiltraten von RA-Patienten zahlreich vorhandenen aktivierten T-Zellen nur geringe Zytokinmengen sezernieren. Trotz verminderter Zytokinsekretion führten Th-Zellen in der Kokultur zu einer Aktivierung der Synoviozyten durch direkten Zellkontakt. Vermutlich kommt den Th-Zellen deshalb auch *in vivo* eine wichtige Funktion bei der Stimulierung über Zell-Zell-Kontakt zu. Da alle Th-Subpopulationen zu einer starken Stimulierung der Synoviozyten führten, wurde ferner geprüft, ob diese Interaktionen durch lösliche Zytokine beeinflußt werden können. TGF- β 1 steigerte die IL-6-, MMP-9-, TIMP-2- und PGE₂-Sekretion von Synoviozyten in den Kokulturen, obwohl der Wachstumsfaktor auf die T-Zell-Aktivität inhibierend wirkte. Hemmend wirkte TGF- β 1 lediglich auf NO, VCAM-1 und MMP-3. Eine Modulation der Interaktionen durch IFN- γ führte zu keiner deutlichen Veränderung der MMP-Aktivität. Stattdessen wurde die NO-Sekretion stark und die IL-6-Sekretion sowie die VCAM-1-Expression leicht erhöht. IL-4 führte dagegen zu einer ausgeprägten Abnahme der MMP-Gesamtaktivität in der Kokultur, stimulierte jedoch auch die IL-6- und PGE₂-Sekretion, während sich die VCAM-1-Expression nicht veränderte. Insgesamt zeigen diese Befunde, daß eine Modulation der Interaktionen durch Zytokine möglich ist, jedoch keines der eingesetzten Zytokine zu einer allgemeinen Hemmung der Synoviozytenaktivität führte.

Die Ergebnisse der Untersuchungen deuten darauf hin, daß eine Verschiebung des Th1/Th2-Verhältnisses zugunsten der Th2-Zellen die Synoviozytenaktivität nicht grundsätzlich reduziert. Auch eine Reihe von In-vivo-Untersuchungen lassen eine erfolgversprechende Therapie mit einer Veränderung des Th1/Th2-Verhältnisses anzweifeln, da in Tiermodellen die Modulation der Arthritis durch Senkung des IFN- γ -Spiegels oder durch Steigerung des IL-4-Spiegels nur unter bestimmten Voraussetzungen zu einem milderen Krankheitsverlauf führt. Die Zytokine sind in ein komplexes Netzwerk der humoralen und zellulären Antworten eingebunden. Autoimmunreaktionen können daher nicht nur als reine Th1- oder Th2-Überreaktionen verstanden werden. Neben den Th-Zellen spielen auch andere Zellen, insbesondere Makrophagen, mesenchymale, B- und NK-Zellen eine wichtige Rolle im Pathogeneseprozeß der Erkrankung, deren Funktionen bei einer Modulation der Arthritis berücksichtigt werden müssen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aarvak T, Chabaud M, Miossec P and Natvig JB (1999) IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells, *J Immunol* 162 (3): 1246-51.
- Adorini L, Guery JC and Trembleau S (1996) Manipulation of the Th1/Th2 cell balance: an approach to treat human autoimmune diseases? *Autoimmunity* 23 (1): 53-68.
- Akbar AN, Lord JM and Salmon M (2000) IFN-alpha and IFN-beta: a link between immune memory and chronic inflammation, *Immunol Today* 21 (7): 337-42.
- Aloisi F, De Simone R, Columba-Cabezas S and Levi G (1999) Opposite effects of interferon-gamma and prostaglandin E2 on tumor necrosis factor and interleukin-10 production in microglia: a regulatory loop controlling microglia pro- and anti-inflammatory activities, *J Neurosci Res* 56 (6): 571-80.
- Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ and Firestein GS (1990) Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes, *J Clin Invest* 86 (6): 1790-8.
- Andoh A, Takaya H, Makino J, Sato H, Bamba S, Araki Y, Hata K, Shimada M, Okuno T, Fujiyama Y and Bamba T (2001) Cooperation of interleukin-17 and interferon-gamma on chemokine secretion in human fetal intestinal epithelial cells, *Clin Exp Immunol* 125 (1): 56-63.
- Attur MG, Dave MN, Stuchin S, Kowalski AJ, Steiner G, Abramson SB, Denhardt DT and Amin AR (2001) Osteopontin: an intrinsic inhibitor of inflammation in cartilage, *Arthritis Rheum* 44 (3): 578-84.
- Austrup F, Vestweber D, Borges E, Löhning M, Bräuer R, Herz U, Renz H, Hallmann R, Scheffold A, Radbruch A and Hamann A (1997) P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues, *Nature* 385: 81-83.
- Bernabeu C, Perez-Maceda B, Lopez-Bote J, Marquet A and Larraga V (1987) Biochemical analysis of synoviocytes from normal and arthritic rats. Evidence for an activated state associated with adjuvant polyarthritis, *Eur J Biochem* 162: 16-173.
- Berner B, Akca D, Jung T, Muller GA and Reuss-Borst MA (2000) Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry, *J Rheumatol* 27 (5): 1128-35.
- Bewsey KE WC, Purple C and Homandberg GA (1996) Fibronectin fragments induce the expression of stromelysin-1 mRNA and protein in bovine chondrocytes in monolayer culture; *Biochim Biophys Acta* 1317: 55-64.
- Billiau A and Matthys P (2001) Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases, *J Leukoc Biol* 70 (6): 849-60.
- Billiau A, Heremans H, Vermeire K and Matthys P (1998) Immunomodulatory properties of interferon-gamma. An update, *Ann N Y Acad Sci* 856: 22-32.
- Boe A, Baiocchi M, Carbonatto M, Papoian R and Serlupi-Crescenzi O (1999) Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis, *Cytokine* 11 (12): 1057-64.

- Boissier MC, Chiochia G, Bessis N, Hajnal J, Garotta G, Nicoletti F and Fournier C **(1995)** Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis, *Eur J Immunol* 25 (5): 1184-90.
- Bombara MP, Webb DL, Conrad P, Marlor CW, Sarr T, Ranges GE, Aune TM, Greve JM and Blue ML **(1993)** Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines, *J Leukoc Biol* 54 (5): 399-406.
- Boots AM, Wimmers Bertens AJ and Rijnders AW **(1994)** Antigen-presenting capacity of rheumatoid synovial fibroblasts, *Immunology* 82 (2): 268-74.
- Borden P and Heller RA **(1997)** Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 7 (1-2): 159-78.
- Borger P, Vellenga E, Gringhuis SI, Timmerman JA, Lummen C, Postma DS and Kauffman HF **(1998)** Prostaglandin E2 differentially modulates IL-5 gene expression in activated human T lymphocytes depending on the costimulatory signal, *J Allergy Clin Immunol* 101 (2 Pt 1): 231-40.
- Borghaei RC, Rawlings PL, Jr. and Mochan E **(1998)** Interleukin-4 suppression of interleukin-1-induced transcription of collagenase (MMP-1) and stromelysin 1 (MMP-3) in human synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum* 41 (8): 1398-406.
- Brabletz T, Pfeuffer I, Schorr E, Siebelt F, Wirth T and Serfling E **(1993)** Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site, *Mol Cell Biol* 13 (2): 1155-62.
- Brennan FM, Hayes AL, Ciesielski CJ, Green P, Foxwell BM and Feldmann M **(2002)** Evidence that rheumatoid arthritis synovial T cells are similar to cytokine-activated T cells: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB pathways in tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 46 (1): 31-41.
- Burger D and Dayer JM: Interactions between T cell plasma membranes and monocytes. In: Miossec P, van den Berg WB, Firestein GS (eds): T cells in arthritis, Birkhäuser Verlag Basel **(1998)** 111-28.
- Burger D and Dayer JM **(2002)** The role of human T-lymphocyte-monocyte contact in inflammation and tissue destruction, *Arthritis Res* 4 Suppl 3: 169-76.
- Burger D, Rezzonico R., Li JM, Modoux C, Pierce RA, Welgus HG and Dayer JM **(1998)** Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: Involvement of membrane-associated cytokines, *Arthritis Rheum* 41 (10): 1748-59.
- Burmester GR, Stuhlmüller B, Keyszer G and Kinne RW **(1997)** Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis: Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum* 40 (1): 5-18.
- Busso N, Peclat V, Van-Ness K, Kolodzieszyk E, Degen J, Bugge T and So A **(1998)** Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice, *J Clin Invest* 102 (1): 41-50.
- Caggiano AO and Kraig RP **(1998)** Prostaglandin E2 and 4-aminopyridine prevent the lipopolysaccharide-induced outwardly rectifying potassium current and interleukin-1beta production in cultured rat microglia, *J Neurochem* 70 (6): 2357-68.
- Campbell IK, O'Donnell K, Lawlor KE and Wicks IP **(2001)** Severe inflammatory arthritis and lymphadenopathy in the absence of TNF, *J Clin Invest* 107 (12): 1519-27.

- Carmichael DF, Stricklin GP and Stuart JM (1989) Systemic administration of TIMP in the treatment of collagen-induced arthritis in mice, *Agents Actions* 27: 378-79.
- Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL and Miossec P (1998) Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines, *J Immunol* 161 (1): 409-14.
- Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L and Miossec P (1999) Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium, *Arthritis Rheum* 42 (5): 963-70.
- Chizzolini C, Rezzonico R, De Luca C, Burger D and Dayer JM (2000) Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes, *J Immunol* 164 (11): 5952-60.
- Chizzolini C, Rezzonico R, Ribbens C, Burger D, Wollheim FA and Dayer JM (1998) Inhibition of type I collagen production by dermal fibroblasts upon contact with activated T cells: Different sensitivity to inhibition between systemic sclerosis and control fibroblasts, *Arthritis Rheum* 41 (11): 2039-47.
- Clancy RM, Amin AR and Abramson SB (1998) The role of nitric oxide in inflammation and immunity, *Arthritis Rheum* 41 (7): 1141-51.
- Cohen S, Hurd E, Cush J, Schiff M, Weinblatt ME, Moreland LW, Kremer J, Bear MB, Rich WJ and McCabe D (2002) Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Arthritis Rheum* 46 (3): 614-24.
- Cooper SM, Sriram S and Ranges GE (1988) Suppression of murine collagen-induced arthritis with monoclonal anti-Ia antibodies and augmentation with IFN-gamma, *J Immunol* 141 (6): 1958-62.
- Corrigall VM, Solau-Gervais E and Panayi GS (2000) Lack of CD80 expression by fibroblast-like synoviocytes leading to anergy in T lymphocytes, *Arthritis Rheum* 43 (7): 1606-15.
- Corrigall VM, Arastu M, Khan S, Shah C, Fife M, Smeets T, Tak PP and Panayi GS (2001) Functional IL-2 receptor beta (CD122) and gamma (CD132) chains are expressed by fibroblast-like synoviocytes: activation by IL-2 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production, *J Immunol* 166 (6): 4141-7.
- Crocker PR, Jefferies WA, Clark SJ, Chung LP and Gordon S (1987) Species heterogeneity in macrophage expression of the CD4 antigen, *J Exp Med* 166 (2): 613-8.
- Cush J and Lipsky P (1991) Cellular basis for rheumatoid inflammation, *Clin Orthop Rel Res* 265: 9-22.
- Cutolo M, Sulli A, Barone A, Seriola B and Accardo S (1993) Macrophages, synovial tissue and rheumatoid arthritis, *Clin Exp Rheumatol* 11: 331-39.
- Dahlberg L, Billingham RC, Manner P, Nelson F, Webb G, Ionescu M, Reiner A, Tanzer M, Zukor D, Chen J, van Wart HE and Poole AR (2000) Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a

- synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1), *Arthritis Rheum* 43 (3): 673-82.
- Dalbeth N and Callan MF **(2002)** A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints, *Arthritis Rheum* 46 (7): 1763-72.
- Damsky C, Tremble P and Werb Z: Signal transduction via the fibronectin receptor: do integrins regulate matrix remodelling? In: Birkedal-Hansen H, Werb Z, Welgus H and Van Wart H (eds): Matrix Metalloproteinases and Inhibitors, Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York **(1992)** 184-91.
- Davis LS, Cush JJ, Schulze-Koops H and Lipsky PE **(2001)** Rheumatoid synovial CD4+ T cells exhibit a reduced capacity to differentiate into IL-4-producing T-helper-2 effector cells, *Arthritis Res* 3 (1): 54-64.
- Dayer JM and Burger D **(1999)** Cytokines and direct cell contact in synovitis: relevance to therapeutic intervention, *Arthritis Res* 1 (1): 17-20.
- De Boer ML, Hu J, Kalvakolanu DV, Hasday JD and Cross AS **(2001)** IFN-gamma inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta in primary murine macrophages via a Stat1-dependent pathway, *J Interferon Cytokine Res* 21 (7): 485-94.
- Demeure CE, Yang LP, Desjardins C, Raynauld P and Delespesse G **(1997)** Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines, *Eur J Immunol* 27 (12): 3526-31.
- Dolhain RJ, ter Haar NT, Hoefakker S, Tak PP, de Ley M, Claassen E, Breedveld FC and Miltenburg AM **(1996)** Increased expression of interferon (IFN)-gamma together with IFN-gamma receptor in the rheumatoid synovial membrane compared with synovium of patients with osteoarthritis, *Br J Rheumatol* 35 (1): 24-32.
- Douthwaite JA, Johnson TS, Haylor JL, Watson P and El Nahas AM **(1999)** Effects of transforming growth factor-beta1 on renal extracellular matrix components and their regulating proteins, *J Am Soc Nephrol* 10 (10): 2109-19.
- Edwards JCW: Fibroblast synovial lining cells (synoviocytes). In: Henderson B, Edwards JCW, Pettipher E.R (eds): Mechanisms and Models in Rheumatoid Arthritis, Academic Press New York **(1995)** 153-59.
- Fasciglione GF, Marini S, D'Alessio S, Politi V and Coletta M **(2000)** pH- and temperature-dependence of functional modulation in metalloproteinases. A comparison between neutrophil collagenase and gelatinases A and B, *Biophys J* 79 (4): 2138-49.
- Fassbender HG and Simmling-Annefeld M **(1983)** The potential aggressiveness of synovial tissue in rheumatoid arthritis, *J Pathol* 139 (3): 399-406.
- Feldmann M, Brennan FM and Maini RN **(1996)** Role of cytokines in rheumatoid arthritis, *Annu Rev Immunol* 14: 397-440.
- Fields G: Using fluorogenic peptide substrates to assay matrix metalloproteinases. In: Clark I (eds): Methods in Molecular Biology, Humana Press **(2000)** 495-518.
- Finnegan A, Mikecz K, Tao P and Glant TT **(1999)** Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines, *J Immunol* 163 (10): 5383-90.

- Fischer D-C **(1992)** Isolierung, biochemische und immunochemische Charakterisierung der Proteoglycane des humanen Gelenkknorpels, *Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinisch-Westfälische TH Aachen*.
- Fossiez F, Banchereau J, Murray R, Van Kooten C, Garrone P and Lebecque S **(1998)** Interleukin-17, *Int Rev Immunol* 16 (5-6): 541-51.
- Franz JK, Pap T, Hummel KM, Nawrath M, Aicher WK, Shigeyama Y, Muller-Ladner U, Gay RE and Gay S **(2000)** Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 43 (3): 599-607.
- Gaston JS **(1998)** Role of T-cells in the development of arthritis, *Clin Sci Colch* 95 (1): 19-31.
- Gay S, Gay RE and Koopmann WJ **(1993)** Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction, *Ann Rheum Dis* 52: S39-47.
- Gold KN, Weyand CM and Goronzy JJ **(1994)** Modulation of helper T cell function by prostaglandins, *Arthritis Rheum* 37 (6): 925-33.
- Graf Beth A, Nazarenko DA, Borrello MA, Roberts LJ, Morrow JD, Palis J and Phipps RP **(1999)** Biphenotypic B/macrophage cells express COX-1 and up-regulate COX-2 expression and prostaglandin E2 production in response to pro-inflammatory signals, *Eur J Immunol* 29 (11): 3793-803.
- Grewal IS and Flavell RA **(1998)** CD40 and CD154 in cell-mediated immunity, *Annu Rev Immunol* 16: 111-35.
- Groux H, O Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, deVries JE and Roncarolo MG **(1997)** A CD4(+) T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis, *Nature* 389: 737-42.
- Guedez YB, Whittington KB, Clayton JL, Joosten LA, van de Loo FA, van den Berg WB and Rosloniec EF **(2001)** Genetic ablation of interferon-gamma up-regulates interleukin-1beta expression and enables the elicitation of collagen-induced arthritis in a nonsusceptible mouse strain, *Arthritis Rheum* 44 (10): 2413-24.
- Haddad A, Bienvenu J and Miossec P **(1998)** Increased production of a Th2 cytokine profile by activated whole blood cells from rheumatoid arthritis patients, *J Clin Immunol* 18 (6): 399-403.
- Harada S, Yamamura M, Okamoto H, Morita Y, Kawashima M, Aita T and Makino H **(1999)** Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 42 (7): 1508-16.
- Harigai M, Hara M, Nakazawa S, Fukasawa C, Ohta S, Sugiura T, Inoue K and Kashiwazaki S **(1999)** Ligation of CD40 induced tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a novel mechanism of activation of synoviocytes, *J Rheumatol* 26 (5): 1035-43.
- Hayashida K, Shimaoka Y, Ochi T and Lipsky PE **(2000)** Rheumatoid arthritis synovial stromal cells inhibit apoptosis and up-regulate Bcl-xL expression by B cells in a CD49/CD29-CD106-dependent mechanism, *J Immunol* 164 (2): 1110-6.
- Hersmann GH, Kriegsmann J, Simon J, Hüttich C and Bräuer R **(1998)** Expression of cell adhesion molecules and cytokines in murine antigen-induced arthritis, *Cell Adhes Commun* 6 (1): 69-82.

- Hilkens CM, Vermeulen H, van Neerven RJ, Snijdwint FG, Wierenga EA and Kapsenberg ML (1995) Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E2 critically depends on interleukin-2, *Eur J Immunol* 25 (1): 59-63.
- Hirano T, Akira S, Taga T and Kishimoto T (1990) Biological and clinical aspects of interleukin 6, *Immunol Today* 11: 443-449.
- Hückel M, Mentzel K, Simon J, Petrow P, Henzgen S and Bräuer R (2001) Induction of chronic arthritis in SCID mice by intraarticular transfer of arthritic synoviocytes from different origin, *Z Rheumatol* 60 ,Suppl 1, 103 (Abstract).
- Imamura F, Aono H, Hasunuma T, Sumida T, Tateishi H, Maruo S, Nishioka K, Mackay CR, Marston WL and Dudley L (1998) Monoclonal expansion of synoviocytes in rheumatoid arthritis; Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation, *Arthritis Rheum* 41 (11): 1979-86.
- Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H and Nozawa-Inoue K (2000) Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint, *Arch Histol Cytol* 63 (1): 17-31.
- Jacobs MJ, van den Hoek AE, van Lent PL, van de Loo FA, van de Putte LB and van den Berg WB (1994) Role of IL-2 and IL-4 in exacerbations of murine antigen-induced arthritis, *Immunology* 83 (3): 390-6.
- Jennings L, Wu L, King KB, Hammerle H, Cs-Szabo G and Mollenhauer J (2001) The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes, *Connect Tissue Res* 42 (1): 71-86.
- Johnatty RN, Taub DD, Reeder SP, Turcovski-Corrales SM, Cottam DW, Stephenson TJ and Rees RC (1997) Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes, *J Immunol* 158 (5): 2327-33.
- Joo YS, Singer NG, Endres JL, Sarkar S, Kinne RW, Marks RM and Fox DA (2000) Evidence for the expression of a second CD6 ligand by synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum* 43 (2): 329-35.
- Joosten LA, Lubberts E, Helsen MM, Saxne T, Coenen-de Roo CJ, Heinegard D and van den Berg WB (1999) Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis, *Arthritis Res* 1 (1): 81-91.
- Jovanovic D, Di Battista J, Martel-Pelletier J, Reboul P, He Y, Jolicoeur F and Pelletier J (2001) Modulation of TIMP-1 synthesis by antiinflammatory cytokines and prostaglandin E2 in interleukin 17 stimulated human monocytes/macrophages, *J Rheumatol* 28 (4): 712-8.
- Kageyama Y, Koide Y, Yoshida A, Uchijima M, Arai T, Miyamoto S, Ozeki T, Hiyoshi M, Kushida K and Inoue T (1998) Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in IFN-gamma receptor, *J Immunol* 161 (3): 1542-8.
- Kaplan C, Valdez JC, Chandrasekaran R, Eibel H, Mikecz K, Glant TT and Finnegan A (2002) Th1 and Th2 cytokines regulate proteoglycan-specific autoantibody isotypes and arthritis, *Arthritis Res* 4 (1): 54-8.
- Kerr LD, Miller DB and Matrisian LM (1990) TGF- β 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a fos binding sequence, *Cell Adhes Commun* 61: 267-78.
- Keyszer G, Heer A and Gay S (1994) Cytokines and oncogenes in cellular interactions of rheumatoid arthritis, *Stem Cells* 12: 75-86.

- Kinne RW, Palombo-Kinne E and Emmrich F **(1997)** T-cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Villaines or accomplices? *Biochim Biophys Acta* 1360: 109-41.
- Kinne R, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E and Burmester GR **(2000)** Macrophages in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res* 2: 189-202.
- Kitagawa H, Toki J, Inaba M, Sugiura K, Ogawa R and Ikehara S **(1993)** Analysis of origin of synovial cells and repairing mechanisms of arthritis by allogeneic bone marrow transplantation, *Immunobiology* 188: 99-112.
- Kittlick P: Glucosaminoglycans, Experimental Pathology, Supplement 10. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, **(1985)**.
- Klimiuk PA, Yang HY, Goronzy JJ and Weyand CM **(1999a)** Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent, *Clin Immunol* 90 (1): 65-78.
- Klimiuk PA, Goronzy JJ and Weyand CM **(1999b)** IL-16 as an anti-inflammatory cytokine in rheumatoid synovitis, *J Immunol* 162 (7): 4293-9.
- Körner H, Riminton DS, Strickland DH, Lemckert FA, Pollard JD and Sedgwick JD **(1997a)** Critical points of tumor necrosis factor action in central nervous system autoimmune inflammation defined by gene targeting, *J Exp Med* 186 (9): 1585-90.
- Körner H, Cook M, Riminton DS, Lemckert FA, Hoek RM, Ledermann B, Kontgen F, Fazekas de St Groth B and Sedgwick JD **(1997b)** Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue, *Eur J Immunol* 27 (10): 2600-9.
- Konttinen YT, Li TF, Hukkanen M, Ma J, Xu JW and Virtanen I **(2000)** Fibroblast biology. Signals targeting the synovial fibroblast in arthritis, *Arthritis Res* 2 (5): 348-55.
- Konttinen YT, Ceponis A, Takagi M, Ainola M, Sorsa T, Sutinen M, Salo T, Ma J, Santavirta S and Seiki M **(1998)** New collagenolytic enzymes/cascade identified at the pannus-hard tissue junction in the rheumatoid arthritis: destruction from above, *Matrix Biol* 17: 585-601.
- Kriegsmann J, Keyszer GM, Geiler T, Bräuer R, Gay RE and Gay S **(1995)** Expression of vascular cell adhesion molecule-1 mRNA and protein in rheumatoid synovium demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry, *Lab Invest* 72 (2): 209-14.
- Kuhn H, Ermann J and Sack U **(1997)** Modulation of hu/mu severe combined immunodeficient (SCID) mouse arthritis by local application of human recombinant IL-1beta, IL-2 and IL-6, *Clin Exp Immunol* 107 (1): 96-102.
- Kuruvilla AP, Shah R, Hochwald GM, Liggitt HD, Palladino MA and Thorbecke GJ **(1991)** Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (7): 2918-21.
- Lehmann I **(2002)** Interaktionen zwischen T-Zellen und Makrophagen bei der experimentellen Arthritis, *Diplomarbeit, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät der FSU Jena*.
- Lehmann J, Jüngel A, Lehmann I, Busse F, Biskop M, Saalbach A, Emmrich F and Sack U **(2000)** Grafting of fibroblasts isolated from the synovial membrane of rheumatoid arthritis (RA) patients induces chronic arthritis in SCID mice - a novel model for studying the arthritogenic role of RA fibroblasts in vivo, *J Autoimmun* 15: 301-13.

- Li JM, Isler P, Dayer JM and Burger D **(1995)** Contact-dependent stimulation of monocytic cells and neutrophils by stimulated human T-cell clones, *Immunology* 84 (4): 571-6.
- Lifke V, Hilgert S, Mori L, Mühl A, Rude E and Schmitt E **(1999)** Abrogation of collagen-induced arthritis in IFN- γ -deficient mice, *Immunobiology* 200 (3-5): 463.
- Lingnau K, Hoehn P, Kerdine S, Koelsch S, Neudoerfl C, Palm N, Ruede E and Schmitt E **(1998)** IL-4 in combination with TGF-beta favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12, *J Immunol* 161 (9): 4709-18.
- Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M and Moser B **(1998)** CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes, *Nature Immunol* 391: 344-45.
- Lombardi G, Dunne PJ, Scheel-Toellner D, Sanyal T, Pilling D, Taams LS, Life P, Lord JM, Salmon M and Akbar AN **(2000)** Type 1 IFN maintains the survival of anergic CD4+ T cells, *J Immunol* 165 (7): 3782-9.
- Lubberts E, Joosten LA, Chabaud M, van den Bersselaar L, Oppers B, Coenen-De Roo CJ, Richards CD, Miossec P and van den Berg WB **(2000)** IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion, *J Clin Invest* 105 (12): 1697-710.
- Lutz MB, Schnare M, Menges M, Rossner S, Rollinghoff M, Schuler G and Gessner A **(2002)** Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF, *J Immunol* 169 (7): 3574-80.
- Mac Lennan IC, Gulbranson Judge A, Toellner KM, Casamayor Pallega M, Chan E, Sze DM, Luther SA and Orbea HA **(1997)** The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop, *Immunol Rev* 156: 53-66.
- Maini RN, Chu CQ and Feldmann M: Aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Henderson B, Edwards JCW, Pettipher E.R. (eds): *Mechanisms and Models in Rheumatoid Arthritis*, Academic Press New York **(1995)** 25-46.
- Matsumoto S, Müller-Ladner U, Gay RE, Nishioka K and Gay S **(1996)** Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts, *J Rheumatol* 23 (8): 1345-52.
- Matthys P, Vermeire K and Billiau A **(2001a)** Mac-1(+) myelopoiesis induced by CFA: a clue to the paradoxical effects of IFN-gamma in autoimmune disease models, *Trends Immunol* 22 (7): 367-71.
- Matthys P, Vermeire K, Mitera T, Heremans H, Huang S and Billiau A **(1998)** Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice, *Eur J Immunol* 28 (7): 2143-51.
- Matthys P, Vermeire K, Mitera T, Heremans H, Huang S, Schols D, De Wolf-Peeters C and Billiau A **(1999)** Enhanced autoimmune arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice is conditioned by mycobacteria in Freund's adjuvant and by increased expansion of Mac-1+ myeloid cells, *J Immunol* 163 (6): 3503-10.
- Matthys P, Hatse S, Vermeire K, Wuyts A, Bridger G, Henson GW, De Clercq E, Billiau A and Schols D **(2001b)** Amd3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1

- chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN-gamma receptor-deficient mice, *J Immunol* 167 (8): 4686-92.
- Mauri C, Williams RO, Walmsley M and Feldmann M (1996) Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis, *Eur J Immunol* 26 (7): 1511-8.
- Maurice MM, Nakamura H, van der Voort EA, van Vliet AI, Staal FJ, Tak PP, Breedveld FC and Verweij CL (1997) Evidence for the role of an altered redox state in hyporesponsiveness of synovial T cells in rheumatoid arthritis, *J Immunol* 158 (3): 1458-65.
- Mauritz NJ, Holmdahl R, Jonsson R, van der Meide PH, Scheynius A and Klareskog L (1988) Treatment with gamma-interferon triggers the onset of collagen arthritis in mice, *Arthritis Rheum* 31 (10): 1297-304.
- McCoy J, Wicks J and Audoly L (2002) The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *J Clin Invest* 110 (5): 651-58.
- McInnes IB, Leung BP and Liew FY (2000) Cell-cell interactions in synovitis; Interactions between T lymphocytes and synovial cells, *Arthritis Res* 2: 374-78.
- McKee CM, Lowenstein CJ, Horton MR, Wu J, Bao C, Chin BY, Choi AMK, Noble PW, Lohmander LS, Saxne T and Heinegard DK (1997) Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor kappa B-dependent mechanism: Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis, *J Biol Chem* 272 (12): 8013-18.
- Mentzel K (1996) Funktioneller Nachweis und Immunlokalisation von Matrixmetalloproteasen in Gelenken mit experimentell induzierter Arthritis, *Dissertation, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, FSU Jena*.
- Mentzel K and Bräuer R (1998) Matrix metalloproteinases, IL-6, and nitric oxide in rat antigen-induced arthritis, *Clin Exp Rheumatol* 16 (3): 269-76.
- Miltenburg AMM, van Laar JM, de Kuiper R, Daha MR and Breedveld FC (1992) T cells cloned from human rheumatoid synovial membrane functionally represent the Th1 subset, *Scand J Immunol* 35 (5): 603-10.
- Miltenburg AMM LS, Welgus HG, Dayer JM (1995) Immobilized anti-CD3 antibody activates T cell clones to induce the production of interstitial collagenase, but not tissue inhibitor of metalloproteinases, in monocytic THP-1 cells and dermal fibroblasts, *J Immunol* 154: 2655-67.
- Miossec P and van den Berg W (1997) Th1/Th2 cytokine balance in arthritis, *Arthritis Rheum* 40 (12): 2105-15.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA and Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *J Immunol* 136 (7): 2348-57.
- Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE and Gay S (1996) Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice, *Am J Pathol* 149 (5): 1607-15.
- Muraille E and Leo O (1998) Revisiting the Th1/Th2 paradigm, *Scand J Immunol* 47 (1): 1-9.

- Murphy G and Knäuper V (1997) Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol* 15 (8-9): 511-8.
- Nagase H (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases, *Biol Chem* 378: 151-60.
- Nakajima H, Takamori H, Hiyama Y and Tsukada W (1990) The effect of treatment with interferon-gamma on type II collagen-induced arthritis, *Clin Exp Immunol* 81 (3): 441-5.
- Nissler K (1999) Wirkung der Anti-CD4-Therapie im experimentellen Arthritismodell, *Dissertation, Medizinische Fakultät der FSU Jena*.
- Nissler K, Pohlers D, Hüchel M, Simon J, Bräuer R, Kinne RW; Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: Influence on macrophage activation, submitted in *J Autoimmun*.
- Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S and Kontinen YT (1998) Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema, *Laby Invest* 78 (9): 1077-87.
- Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, Kopf M, Katada Y, Tanaka T, Suemura M and Kishimoto T (1998) Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (14): 8222-6.
- Olszewski JM, Moore VL, McDonnell J, Williams H, Saphos CA, Green BG, Knight WB, Chapman KT, Hagmann WK, Dorn CP, Hale JJ and Mumford RA (1996) Proteoglycan-degrading activity of human stromelysin-1 and leukocyte elastase in rabbit joints. Quantitation of proteoglycan and a stromelysin-induced HABR fragment of aggrecan in synovial fluid and cartilage, *Connect Tissue Res* 33 (4): 291-9.
- Openshaw P, Murphy EE, Hosken NA, Maino V, Davis K, Murphy K and O'Garra A (1995) Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations, *J Exp Med* 182 (5): 1357-67.
- O'Shea J, Ma A and Lipsky P (2002) Cytokines and autoimmunity, *Nat Rev Immunol* 2 (1): 37-45.
- Otte P: Rheumatologie, Orthopädie, Der Arthrose-Prozeß, Teil1: Osteochondrale Strukturen, Novartis Pharma Verlag, Nürnberg (2000), S.84 und 163.
- Park SH, Min DJ, Cho ML, Kim WU, Youn J, Park W, Cho CS and Kim HY (2001) Shift toward T helper 1 cytokines by type II collagen-reactive T cells in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 44 (3): 561-9.
- Petrow PK, Thoss K, Katenkamp D and Bräuer R (1996a) Adoptive transfer of susceptibility to antigen-induced arthritis into severe combined immunodeficient (SCID) mice: role of CD4+ and CD8+ T cells, *Immunol Invest* 25 (4): 341-53.
- Petrow PK, Thoss K, Henzgen S, Katenkamp D and Bräuer R (1996b) Limiting dilution analysis of the frequency of autoreactive lymph node cells isolated from mice with antigen-induced arthritis, *J Autoimmun* 9 (5): 629-35.
- Petrow PK, Hummel KM, Schedel J, Franz JK, Klein CL, Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Chang PL, Prince CW, Gay RE and Gay S (2000) Expression of osteopontin messenger RNA and protein in rheumatoid arthritis: effects of osteopontin on the release of collagenase 1 from articular chondrocytes and synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum* 43 (7): 1597-605.

- Pohlers D **(2000)** Untersuchungen zur differentiellen Wirkung von verschiedenen anti-CD4 monoklonalen Antikörpern auf T-Zellen, *Dissertation, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Universität Leipzig*.
- Pohlers D, Nissler K, Frey O, Simon J, Petrow P, Kinne RW and Bräuer R; Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: Influence on T helper cell activation, *submitted in J Autoimmun*.
- Qu Z, Garcia C, O'Rourke L, Planck S, Kohli M and Rosenbaum J **(1994)** Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia, *Arthritis Rheum* 37: 212-20.
- Quayle AJ, Chomarat P, Miossec P, Kjeldsen-Kragh J, Forre O and Natvig JB **(1993)** Rheumatoid inflammatory T-cell clones express mostly Th1 but also Th2 and mixed (Th0-like) cytokine patterns, *Scand J Immunol* 38 (1): 75-82.
- Relic B, Guicheux J, Mezin F, Lubberts E, Togninalli D, Garcia I, van den Berg WB and Guerne PA **(2001)** IL-4 and IL-13, but not IL-10, protect human synoviocytes from apoptosis, *J Immunol* 166 (4): 2775-82.
- Rezzonico R, Burger D and Dayer JM **(1998)** Direct contact between T lymphocytes and human dermal fibroblasts or synoviocytes down-regulates types I and III collagen production via cell-associated cytokines, *J Biol Chem* 273 (30): 18720-8.
- Ribbens C, Dayer JM and Chizzolini C **(2000)** CD40-CD40 ligand (CD154) engagement is required but may not be sufficient for human T helper 1 cell induction of interleukin-2- or interleukin-15-driven, contact-dependent, interleukin-1beta production by monocytes, *Immunology* 99 (2): 279-86.
- Rinaldi N und Schwarz-Eywill M **(1999)** Molekulare Mechanismen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen in der Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis, *Z Rheumatol* 58 (6): 333-44.
- Rissoan MC, van Kooten C, Chomarat P, Galibert L, Durand I, Thivolet-Bejui F, Miossec P and Banchereau J **(1996)** The functional CD40 antigen of fibroblasts may contribute to the proliferation of rheumatoid synovium, *Clin Exp Immunol* 106 (3): 481-90.
- Roskelley CD, Srebrow A and Bissell MJ **(1995)** A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue-specific gene expression, *Curr Opin Cell Biol* 7 (5): 736-47.
- Rosloniec E, Latham K and Guedez Y **(2002)** Paradoxical roles of IFN-gamma in models of Th1-mediated autoimmunity, *Arthritis Res* 4 (6): 333-6.
- Ruangpanit N, Price JT, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Guenzler V, Huang X, Chan D, Bateman JF and Thompson EW **(2002)** MT1-MMP-dependent and -independent regulation of gelatinase A activation in long-term, ascorbate-treated fibroblast cultures: Regulation by fibrillar collagen, *Exp Cell Res* 272 (2): 109-18.
- Sack U, Kuhn H, Erdmann J, Kinne RW, Vogt S, Jungmichel D and Emmrich F **(1994)** Synovial tissue implants from patients with rheumatoid arthritis cause cartilage degradation in knee joints of SCID.bg mice, *J Rheumatol* 21: 10-16.
- Sack U, Kuhn H, Kämpfer I, Genest M, Arnold S, Pfeiffer G and Emmrich F **(1996)** Orthotopic implantation of inflamed synovial tissue from RA patients induces a characteristic arthritis in immunodeficient (SCID) mice, *J Autoimmun* 9: 51-58.

- Sakata A, Sakata K, Ping H, Ohmura T, Tsukano M and Kakimoto K **(1996)** Successful induction of severe destructive arthritis by the transfer of in vitro-activated synovial fluid T cells from patients with rheumatoid arthritis (RA) in severe combined immunodeficient (SCID) mice, *Clin Exp Immunol* 104 (2): 247-5.
- Salmon M, Scheel-Toellner D, Huissoon AP, Pilling D, Shamsadeen N, Hyde H, D'Angeac AD, Bacon PA, Emery P and Akbar AN **(1997)** Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium, *J Clin Invest* 99 (3): 439-46.
- Seitz M, Loetscher P, Dewald B, Towbin H and Baggiolini M **(1996)** Opposite effects of interleukin-13 and interleukin-12 on the release of inflammatory cytokines, cytokine inhibitors and prostaglandin E from synovial fibroblasts and blood mononuclear cells, *Eur J Immunol* 26 (9): 2198-202.
- Shimoyama Y, Nagafuchi H, Suzuki N, Ochi T and Sakane T **(1999)** Synovium infiltrating T cells induce excessive synovial cell function through CD28/B7 pathway in patients with rheumatoid arthritis, *J Rheumatol* 26 (10): 2094-101.
- Shiozawa S, Shiozawa K and Fujita T **(1983)** Morphologic observations in the early phase of the cartilage-pannus junction. Light and electron microscopic studies of active cellular pannus, *Arthritis Rheum* 26 (4): 472-8.
- Simon AK, Seipelt E and Sieper J **(1994)** Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (18): 8562-6.
- Simon J **(2000)** Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von T-Helfer-Zellen bei der Antigen-induzierten Arthritis, *Dissertation, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät FSU Jena*.
- Simon J, Surber R, Kleinstäuber G, Petrow PK, Henzgen S, Kinne RW and Bräuer R **(2001)** Systemic macrophage activation in locally-induced experimental arthritis, *J Autoimmun* 17 (2): 127-36.
- Smeets TJ, Dayer JM, Kraan MC, Versendaal J, Chicheportiche R, Breedveld FC and Tak PP **(2000)** The effects of interferon-beta treatment of synovial inflammation and expression of metalloproteinases in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 43 (2): 270-4.
- Smith RS, Smith TJ, Blieden TM and Phipps RP **(1997)** Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation, *Am J Pathol* 151 (2): 317-22.
- Snyder MR, Muegge LO, Offord C, O'Fallon WM, Bajzer Z, Weyand CM and Goronzy JJ **(2002)** Formation of the killer Ig-like receptor repertoire on CD4+CD28null T cells, *J Immunol* 168 (8): 3839-46.
- Stout RD and Suttles J **(1993)** T cell-macrophage cognate interaction in the activation of macrophage effector function by Th2 cells, *J Immunol* 150: 5330-7.
- Summers KL, O'Donnell JL, Heiser A, Highton J and Hart DN **(1999)** Synovial fluid transforming growth factor beta inhibits dendritic cell- T lymphocyte interactions in patients with chronic arthritis, *Arthritis Rheum* 42 (3): 507-18.
- Svensson L, Nandakumar KS, Johansson A, Jansson L and Holmdahl R **(2002)** IL-4-deficient mice develop less acute but more chronic relapsing collagen-induced arthritis, *Eur J Immunol* 32 (10): 2944-53.
- Tak PP and Bresnihan B **(2000)** The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis, *Arthritis Rheum* 43 (12): 2619-33.

- Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, Kaneko M, Takano H, Hashimoto H, Sugamoto K, Suzuki R and Ochi T **(1999)** Establishment and characterization of nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 42 (2): 221-8.
- Thoss K, Henzgen S, Petrow PK, Katenkamp D and Bräuer R **(1996)** Immunomodulation of rat antigen-induced arthritis by leflunomide alone and in combination with cyclosporin A, *Inflamm Res* 45 (2): 103-7.
- Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, Tsuruta Y, Maeda-Tanimura M, Shimaoka Y, Takahashi T, Itoh T, Suzuki R and Ochi T **(2001)** Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines, *Arthritis Res* 3 (5): 306-10.
- Tremble PM, Damsky CH and Werb Z: Fibronectin fragments, but not intact fibronectin, signalling through the fibronectin receptor induce metalloproteinase genes expression in fibroblasts. In: Birkedal-Hansen H, Werb Z, Welgus H and Van Wart H (eds): Matrix Metalloproteinases and Inhibitors, Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York **(1992)** 212-14.
- Unemori E, Hibbs M and Amento E **(1991)** Constitutive expression of a 92kDa gelatinase (type IV collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines, *J Clin Invest* 88: 1656-62.
- van den Berg WB and van Lent PL **(1996)** The role of macrophages in chronic arthritis, *Immunobiology* 195 (4-5): 614-23.
- van Meurs J, van Lent P, Holthuysen A, Lambrou D, Bayne E, Singer I and van den Berg W **(1999)** Active matrix metalloproteinases are present in cartilage during immune complex-mediated arthritis: a pivotal role for stromelysin-1 in cartilage destruction, *J Immunol* 163 (10): 5633-9.
- Veihelmann A, Landes J, Hofbauer A, Dorger M, Refior HJ, Messmer K and Krombach F **(2001)** Exacerbation of antigen-induced arthritis in inducible nitric oxide synthase-deficient mice, *Arthritis Rheum* 44 (6): 1420-7.
- Vermeire K, Thielemans L, Matthys P and Billiau A **(2000)** The effects of NO synthase inhibitors on murine collagen-induced arthritis do not support a role of NO in the protective effect of IFN-gamma, *J Leukoc Biol* 68 (1): 119-24.
- Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M, Huang S, Billiau A and Matthys P **(1997)** Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice, *J Immunol* 158(11): 5507-13.
- Wagner UG, Koetz K, Weyand CM and Goronzy JJ **(1998)** Perturbation of the T cell repertoire in rheumatoid arthritis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (24): 14447-52.
- Warrington KJ, Takemura S, Goronzy JJ and Weyand CM **(2001)** CD4⁺, CD28⁻ T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems, *Arthritis Rheum* 44 (1): 13-20.
- Wernicke D, Schulze-Westhoff C, Bräuer R, Petrow PK, Zacher J, Gay S and Gromnica-Ihle E **(2002)** Stimulation of collagenase 3 expression in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis by contact with a three-dimensional collagen matrix or with normal cartilage when coimplanted in NOD/SCID mice, *Arthritis Rheum* 46 (1): 64-74.
- Weyand CM **(2000)** New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Rheumatology* 39 Suppl 1: 3-8.

- Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA and Cowden WB (1999) IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide, *J Immunol* 163 (10): 5278-86.
- Wu C, Kirman J, Rotte M, Davey D, Perfett S, Rhee E, Freitag B, Hill B, Douek D and Seder R (2002) Distinct lineages of Th1 cells have different capacities for memory cell generation in vivo, *Nature Immunol* 3 (9): 852-58.
- Yamamura Y, Gupta R, Morita Y, He X, Pai R, Endres J, Freiberg A, Chung K and Fox DA (2001) Effector function of resting T cells: Activation of synovial fibroblasts, *J Immunol* 166 (4): 2270-75.
- Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, Maki RA, Tortorella MD, Arner EC and Firestein GS (2002) Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta, *J Immunol* 168 (3): 1405-12.
- Yang YH, Carmeliet P and Hamilton JA (2001) Tissue-type plasminogen activator deficiency exacerbates arthritis, *J Immunol* 167 (2): 1047-52.
- Yanni G, Whelan A, Feighery C and Bresnihan B (1994) Synovial tissue macrophages and joint erosion in rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis* 53: 39-44.
- Yarovinsky TO and Hunninghake GW (2001) Lung fibroblasts inhibit activation-induced death of T cells through PGE(2)-dependent mechanisms, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281 (5): L1248-56.
- Yasuda T and Poole AR (2002) A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated pathway, *Arthritis Rheum* 46 (1): 138-48.
- Yoshino S and Yoshino J (1998) Enhancement of T-cell-mediated arthritis in mice by treatment with a monoclonal antibody against interleukin-4, *Cell Immunol* 185 (2): 153-7.
- Yuan W and Varga J (2001) Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3, *J Biol Chem* 276 (42): 38502-10.
- Zenmyo M, Hiraoka K, Sasaguri T, Komiya S, Inoue A, Morimatsu M and Sasaguri Y (1996) Interleukin-4 stimulates rheumatoid synovial fibroblasts to express matrix metalloproteinase-1 (tissue collagenase) and histamine H1 receptor mRNA, *Biochem Mol Biol Int* 40: 1253-60.
- Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl HD, Sack U, Laube A, Liesaus E, Roth A, Palombo-Kinne E, Emmrich F and Kinne RW (2001) Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture - Primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells, *Arthritis Res* 3 (1): 72-6.
- Ziolkowska M, Koc A, Luszczykiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H and Maslinski W (2000) High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism, *J Immunol* 164 (5): 2832-8.
- Zschäbitz A, Stofft E, Reichling T, Rude J and Kramer M (1988) Zur Morphologie der Synovialozyten des Menschen in Organ- und Explantatkulturen *Z Rheumatol* 47: 30-36.
- Zvaifler N and Firestein GS (1994) Pannus and pannocytes, *Arthritis Rheum* 37: 738-89.

7 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf Bräuer für die interessante Themenstellung, die intensive Betreuung mit zahlreichen Diskussionen und Anregungen und die mir jederzeit gewährte, großzügige Unterstützung während der gesamten Arbeit am Institut für Pathologie.

Auch bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, Heidemarie Börner, Uta Griechen, Cornelia Hüttich, Waltraud Kröber und Renate Stöckigt möchte ich mich für die Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten sehr bedanken.

Herrn Prof. Dr. Radbruch, Dr. Alexander Scheffold und Frank Hartung vom DRFZ Berlin danke ich sehr für die Hilfe bei der Präparation der Th-Subpopulation und für die zahlreichen Diskussionen und Denkanstöße.

Herrn Dr. Richter, Frau Kaiser und Frau Beck vom Institut für Ultrastrukturforschung danke ich sehr herzlich für die Hilfe bei den Präparationen für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Außerdem bedanke ich mich sehr bei Herrn Dr. K. Thoss für die hilfreiche Unterstützung in der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Dr. Jutta Simon, Dr. Kirstin Mentzel, Oliver Frey, Dr. Dirk Pohlers, Ingo Irmeler und Dr. Uta Schurigt für zahlreiche Diskussionen und das belebende Arbeitsklima.

Meinem Lebensgefährten, Stefan Prass, danke ich für seine unendliche Geduld, seine konstruktiven Kritiken und seine vielfältigen Unterstützungen in allen Lebenslagen.

Meiner Mutter danke ich für ihre vielseitigen Unterstützungen und Aufmunterungen.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 25.03.2003

Marion Hückel

LEBENS LAUF

Marion Hückel geb. am 15.04.1966 in Saarbrücken, Deutschland

Ausbildung:

- | | |
|-------------------|--|
| 1972-1976 | Grundschule Mühlenweg, Hannover, |
| 1976-1985 | Gymnasium Misburg, Hannover |
| 1985 | Abitur |
| 1985-1988 | Fachschule K. Blindow, Hannover
Ausbildung zur Pharmazeutisch-technischen Assistentin
Abschluß PTA |
| 1988-1992 | Studium der Biotechnologie, Techn. Fachhochschule Berlin,
Abschluss Dipl.-Ing. (FH) für Biotechnologie |
| 08/1990 - 02/1991 | Praktikum beim Zentraltechnikum der Preussag AG, Berkhöpen
Thema: „Schwermetallentfernung aus Industrieabwässern durch
Biomasse und Ionenaustauscher im Vergleich“ |
| 1992 | Diplomarbeit an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH,
Braunschweig
Thema: „Reinigung und Immobilisierung der Quecksilberreduktase aus
Pseudomonas putida, sowie deren Untersuchung zur Anwendung für
Quecksilber belastete Abwässer“ |

Berufserfahrung / Weiterbildung:

- | | |
|-------------------|---|
| 01/1993 - 02/1993 | Projekt bei International Bio Research Forschungs GmbH, Hannover,
Abt. Biologischer Abbau
Thema: „Prozeßführung einer Laborkläranlage“ |
| 03/1993 - 08/1993 | Visiting Scholar bei der Monash University, Melbourne, Australien
Centre for Bioprocess Technology
Thema: „ Immobilisierung von Proteasen an Sepharose und
Zirconia“ |
| 1994 -1997 | Mitarbeiterin am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V., Jena
Abt. Naturstofftechnikum
Koordination des Projekts: „Entwicklung eines Verfahrens zur
Herstellung einer formstabilen, Gele bildenden Hyaluronsäure für
medizinische Applikationen“ |
| 1997-1998 | Mitarbeiterin bei Abbott Diagnostics GmbH Wiesbaden-Delkenheim
Arbeiten an der Überführung und Validierung eines neuen HIV-
Diagnostik-Produktes |
| seit 1998 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pathologie, Friedrich-Schiller-
Universität Jena, AG „Immunpathologie“ |